

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Desarrollo y validación de un protocolo basado en radiación ultravioleta para la inducción de mutaciones aleatorias en bacterias Gram negativas y Gram positivas para una mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno

Trabajo de graduación presentado por Julio David del Cid Villatoro para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



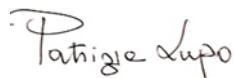
Desarrollo y validación de un protocolo basado en radiación ultravioleta para la inducción de mutaciones aleatorias en bacterias Gram negativas y Gram positivas para una mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno

Trabajo de graduación presentado por Julio David del Cid Villatoro para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2022

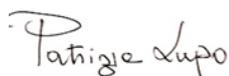
Vo. Bo. :



(firma) _____

PhD. Patrizia Lupo

Tribunal examinador:



(firma) _____

PhD. Patrizia Lupo



(firma) _____

PhD. Luis Diego Archila



(firma) _____

MSc. Julio Roberto Matute

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 6 de diciembre de 2022

Prefacio

Agradezco a Dios por permitirme llegar a completar mi carrera de licenciatura de buena manera. También a mis progenitores, Julio Wilfredo Del Cid Reyes y Emilsa Cristina Villatoro Alvarado de Del Cid, por darme la oportunidad de apoyarme y ayudarme a llegar hasta este punto. A todos los miembros de mi familia que siempre han estado ahí para mí cuando los necesito. A mi asesora, la PhD. Patrizia Lupo por aceptarme como su tesista y su ayuda para la elaboración del presente proyecto. Al MSc. Julio Matute por introducirme al proyecto. A todos los miembros de la Universidad del Valle de Guatemala que fueron de ayuda para poder completar el proyecto.

Tabla de contenido

Prefacio	v
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
III. Justificación	4
IV. Objetivos	5
V. Hipótesis.....	6
VI. Marco teórico	7
A. Importancia fisiológica del nitrógeno en las plantas	7
B. Suplementación artificial de nitrógeno	7
C. Bacterias de la rizosfera y su importancia	8
D. Captación y asimilación de nitrógeno	9
E. Fijación biológica de nitrógeno por bacterias diazótrofes	10
F. Mutagénesis inducida por radiación Ultravioleta (UV)	12
G. Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno	13
VIII. Resultados	22
IX. Análisis de resultados.....	34
X. Conclusiones	37
XI. Recomendaciones.....	38
XIII. Anexos.....	50

Lista de cuadros

Cuadro	Página
Cuadro 1. Resumen de la selección del modelo linear mixto generalizado propuesto para predecir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas analizadas...	24
Cuadro 2. Tamaño del efecto, error estándar e intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas.....	24
Cuadro 3. Resumen de la selección del modelo linear mixto generalizado propuesto para explicar la presencia o ausencia de crecimiento de <i>L. sphaericus</i> en función del tiempo de exposición a radiación UV.....	25
Cuadro 4. Tamaño del efecto, error estándar e intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los <i>pools</i> de mutantes generados.....	26
Cuadro 5. Resumen de la selección del modelo linear mixto generalizado propuesto para predecir la cantidad de amonio fijado por los <i>pools</i> mutantes generados.....	27
Cuadro 6. Tamaño del efecto, error estándar e intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los <i>pools</i> de mutantes generados.....	28
Cuadro 7. Resumen de la selección del modelo linear mixto generalizado para predecir la cantidad de amonio fijado por los <i>pools</i> mutantes generados de <i>L. sphaericus</i>	30
Cuadro 8. Tamaño del efecto, error estándar e intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los <i>pools</i> de mutantes generados para <i>L. sphaericus</i>	31
Cuadro 9. Resumen de la selección del modelo linear mixto generalizado para predecir la cantidad de amonio fijado por los <i>pools</i> mutantes generados de <i>K. oxytoca</i>	33
Cuadro 10. Tamaño del efecto, error estándar e intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los <i>pools</i> de mutantes generados para <i>K. oxytoca</i>	33
Cuadro 11. Mapa de carga para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los <i>pools</i> de mutantes de <i>L. sphaericus</i>	50
Cuadro 12. Lecturas de absorbancia originales para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los <i>pools</i> de mutantes de <i>L. sphaericus</i>	51

Cuadro 13. Mapa de carga para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los <i>pools</i> de mutantes de <i>K. oxytoca</i>	51
Cuadro 14. Lecturas de absorbancia originales para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los <i>pools</i> de mutantes de <i>K. oxytoca</i>	52

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Estructura general de la clorofila.....	7
Figura 2. Mecanismos por los cuales las PGPB contribuyen al aumento de la productividad en cultivos.....	9
Figura 3. Asimilación de NO_3^- y NH_4^+	9
Figura 4. Representación esquemática de un fragmento del operón <i>nifLA</i>	10
Figura 5. Mecanismos por los cuales la cafeína inhibe la reparación de mutaciones.....	13
Figura 6. Protocolo final desarrollado para inducir mutaciones aleatorias mediante radiación UV a 425nm y evaluar su efecto sobre la capacidad productora de amonio de los mutantes evaluados.....	22
Figura 7. Curva de supervivencia elaborada para las bacterias Gram negativas analizadas tras exposición a radiación UV	23
Figura 8 Diagrama de violín elaborado para el crecimiento de <i>L. sphaericus</i> tras exposición a radiación UV.....	25
Figura 9. NMDS para evaluar las diferencias en la concentración de amonio producido tras 48 horas, acorde a las especies y tiempos evaluados	26
Figura 10. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de <i>K. oxytoca</i> y <i>L. sphaericus</i> generados tras su exposición a radiación	27
Figura 11. NMDS para evaluar las diferencias en la concentración de amonio producido tras 48 horas por parte de los pools de <i>L. sphaericus</i>	29
Figura 12. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de <i>L. sphaericus</i> generados tras su exposición a radiación UV	29
Figura 13. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de <i>L. sphaericus</i> , acorde al tiempo de exposición a radiación UV	30
Figura 14. NMDS para evaluar las diferencias en la concentración de amonio producido tras 48 horas por parte de los pools de <i>K. oxytoca</i> en los tiempos evaluados.....	31

Figura 15. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de <i>K. oxytoca</i>	32
Figura 16. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de <i>K. oxytoca</i> , acorde al tiempo de exposición a radiación UV.....	32
Figura 17. Prueba cualitativa para la producción de amonio por parte de los <i>pools</i> de mutantes de <i>L. sphaericus</i>	50
Figura 18. Prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los <i>pools</i> de mutantes de <i>L. sphaericus</i>	51
Figura 19. DHARMA para el modelo más parsimonioso para describir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas.....	52
Figura 20. Prueba de sobredispersión para el modelo para describir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas.....	52
Figura 21. DHARMA para el modelo más parsimonioso para describir la presencia de crecimiento de <i>L. sphaericus</i>	53
Figura 22. Prueba de sobredispersión para el modelo para describir la presencia de crecimiento de <i>L. sphaericus</i>	53
Figura 23. DHARMA para el modelo seleccionado para evaluar la producción de amonio por los mutantes evaluados.....	54
Figura 24. DHARMA para el modelo seleccionado para evaluar la producción de amonio por los <i>pools</i> de mutantes de <i>L. sphaericus</i> evaluados.....	54
Figura 25. DHARMA para el modelo seleccionado para evaluar la producción de amonio por los <i>pools</i> de mutantes de <i>K. oxytoca</i> evaluados.....	55
Figura 26. Screening inicial para seleccionar las bacterias fijadoras de nitrógeno con medio selectivo libre de cafeína.....	55
Figura 27. Screening inicial para seleccionar las bacterias fijadoras de nitrógeno con medio selectivo con cafeína al 0.3%.....	56

Resumen

El precio de los fertilizantes nitrogenados y el daño ambiental que ocasionan hacen necesario buscar alternativas para reducir su consumo. Gracias a la fijación biológica de nitrógeno, es posible utilizar microorganismos para obtener compuestos nitrogenados captables por los cultivos a partir de nitrógeno atmosférico, mediante el complejo enzimático nitrogenasa. El objetivo del estudio fue el desarrollar un protocolo que permitiera utilizar radiación ultravioleta (UV) a 254nm para inducir mutaciones aleatorias en *Lysinibacillus sphaericus* y *Klebsiella oxytoca* para mejorar su capacidad fijadora de nitrógeno. De igual manera, se buscó cuantificar el nitrógeno fijado tras llevar a cabo dicho procedimiento. Se desarrolló el protocolo a partir de revisión literaria y pruebas experimentales. Se utilizaron, bajo las condiciones de irradiación disponibles, 3 y 4 segundos de radiación UV para la mutagénesis. Se utilizó medio Burk para la selección de bacterias capaces de fijar nitrógeno. El nitrógeno fijado se evaluó en forma de producción de amonio, mediante prueba con reactivo de Nessler. Tras ejecutar el protocolo elaborado, se obtuvieron 7 *pools* de *L. sphaericus* con aparente mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno. Por su parte, para *K. oxytoca* no se obtuvieron *pools* que contuvieran mutantes con aparente mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno. En conclusión, el protocolo elaborado es útil tanto para evaluar el efecto de la radiación ultravioleta sobre la producción de amonio por parte de bacterias. Para futuros estudios, se recomienda secuenciar los genes *nif* de los mutantes generados para identificar mutaciones de interés a inducir mediante un ensayo de mutagénesis dirigida.

Abstract

The price of nitrogenous fertilizers and the environmental damage they cause make it necessary to search for alternatives, in order to reduce their consumption. Thanks to biological nitrogen fixation, it is possible to use microorganisms to obtain nitrogenous compounds that can be taken up by crops from atmospheric nitrogen, by means of the nitrogenase enzyme complex. The objective of the study was to develop a protocol that would allow the use of ultraviolet (UV) radiation at 254nm to induce random mutations in *Lysinibacillus sphaericus* and *Klebsiella oxytoca* to improve their nitrogen-fixing capacity. In the same way, it was sought to quantify the fixed nitrogen after carrying out said procedure. The protocol was developed from literature review and experimental tests. Under the available irradiation conditions, 3 and 4 seconds of UV radiation were used for mutagenesis. Burk's medium was used for the selection of bacteria capable of fixing nitrogen. Fixed nitrogen was evaluated as ammonium production, by Nessler's reagent test. After executing the elaborated protocol, 7 pools of *L. sphaericus* with apparent improvement in their nitrogen-fixing capacity were obtained. On the other hand, for *K. oxytoca* no pools were obtained with an apparent improvement in its nitrogen-fixing capacity. In conclusion, the developed protocol is useful to evaluate the effect of ultraviolet radiation on ammonium production by bacteria. For future studies, it is recommended to sequence the *nif* genes of the generated mutants to identify mutations of interest to be induced by means of a directed mutagenesis assay.

I. Introducción

Para el año 2020, el sector agropecuario representaba un 10.8% del PIB de Guatemala y los principales productos de exportación dentro del sector agrícola representaba una contribución del 36.2% a la balanza comercial del país (España Exportación e Inversiones [ICEX], 2021). El nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento de los cultivos (Rilling, *et al.*, 2018). Las plantas no son capaces de asimilar nitrógeno molecular de forma directa, por lo que requieren que dicho nutriente se encuentre en una forma captable por sus raíces (Anas, *et al.*, 2020).

Para suplir la demanda de nitrógeno, se hace uso de fertilizantes nitrogenados (Gruber y Galloway, 2008). Esto puede llevar a consecuencias no deseadas como la acidificación del suelo, generación de gases de efecto invernadero y la contaminación de cuerpos de agua (Schroder, *et al.*, 2011)(Chai, *et al.*, 2019)(Wonganit, *et al.*, 2015). Adicionalmente, esta actividad representa una inversión considerable, llegando el fertilizante nitrogenado basado en urea a precios que superan los 800 dólares estadounidenses por tonelada (Schmidhuber, 2022, diapositiva 3). Un aumento en los precios de fertilizante puede llevar a productos agrícolas más caros o a una menor ganancia para los agricultores (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA], 2022). Las bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de metabolizar nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio, de manera que este puede ser utilizado por las plantas (Mahmud, *et al.*, 2020) (Rosenblueth, *et al.*, 2018). Este proceso representa un beneficio tanto económico como ambiental.

La fijación de nitrógeno por parte de bacterias diazótrofes es posible gracias a la actividad de complejos enzimáticos nitrogenasa. La nitrogenasa más eficiente en cuanto a fijación de nitrógeno es la codificada por los genes *nif* (Miller y Eady, 1988). La organización y expresión de este cluster de genes varía entre bacterias diazótrofes, así como su expresión (Dai, *et al.*, 2014). Se ha reportado que mutaciones inducidas en *K. pneumoniae* que no expresan de forma constitutiva este complejo enzimático pasen a hacerlo tras la aparición de la mutación (Sibold y Elmerich, 1982). Por otra parte, estudios con *L. sphaericus* han demostrado que cepas comúnmente aisladas del suelo tienen capacidad de fijar nitrógeno de forma constitutiva (Martínez y Dussán, 2017). En el caso de *P. aeruginosa*, se ha reportado la capacidad de cepas aisladas de suelo de fijar nitrógeno; adicionalmente, se ha descrito su capacidad desnitrificante, siendo capaz de transformar gases nitrogenados de efecto invernadero en nitrógeno molecular, el cual puede ser fijado (Ghadamgahi, *et al.*, 2022) (Arat, *et al.*, 2015).

La mutación del genoma es un proceso que puede darse de forma espontánea, sin embargo, la radiación ultravioleta (UV) es un factor extrínseco que aumenta la tasa de aparición de mutaciones en el genoma (Shibai, *et al.*, 2017). Este factor representa una herramienta conveniente para la inducción de mutaciones, dado su bajo costo y fácil uso (Mullins, *et al.*, 2021).

Con esto en consideración, el objetivo del estudio es el desarrollar y validar un protocolo que permita utilizar radiación UV para inducir mutagénesis aleatoria en *K. pneumoniae*, *L. sphaericus* y *P. aeruginosa*, con el fin de mejorar su capacidad fijadora de nitrógeno.

II. Antecedentes

La radiación UV como agente mutagénico aleatorio para la mejora de procesos ha sido demostrado previamente. Por ejemplo, Joshi y colaboradores (2013), usaron dicha radiación en *Pseudomonas* sp. para mejorar la biodegradación de un tinte azo sulfonado, logrando aumentar la velocidad de dicho proceso en un 25%. En otro ejemplo Watanabe y colaboradores (2011) la utilizaron en *Pichia stipitis*, obteniendo un mutante con tolerancia aumentada al etanol y uno con producción de etanol aumentada a partir de xilosa.

En cuanto a la fijación de nitrógeno, se han hecho ensayos mutagénicos basados en agentes químicos y otros tipos de radiación para mejorar el rendimiento de dicho proceso, ejemplo de ello es el caso de Kucho y colaboradores (2017), quienes usaron metil-nitro-nitrosoguanidina y radiación gamma sobre *Frankia casuarinae* obteniendo 12 mutantes con capacidad de fijar nitrógeno. Con radiación UV, Shanavavas (2007) mutó *Azotobacter* sp., obteniendo 2 cepas mutantes con capacidad reductora de acetileno mejorada.

En Guatemala, no se encuentran publicados ensayos de mutagénesis para la mejora de un rasgo fenotípico. A nivel latinoamericano, en Nicaragua, Rayo (2021) utilizó rayos X para la mutagénesis aleatoria en *Xanthosoma sagittifolium* y en *X. violaceum*, para obtener una mejora genética en dichas especies, obteniendo mutantes con mejoras en rasgos como peso de planta, número de hojas y número de brotes. En Perú, Pérez y colaboradores (2021) utilizaron Azida de Sodio como agente mutagénico en *Gladiolus grandiflorus*, obteniendo un efecto deseable tomando en cuenta variables como longitud de raíz, número de hojas, número de tallos, entre otros.

III. Justificación

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos vegetales. Las plantas son incapaces de utilizar el nitrógeno atmosférico de manera directa. De forma artificial, esta carencia se suple mediante la adición de fertilizantes nitrogenados. De forma natural, las bacterias diazótroficas convierten el nitrógeno atmosférico en una forma captable por la planta. La adición de fertilizantes es una práctica muy común, debido a la escala a la que se cultiva, principalmente con fines alimenticios. El uso de fertilizantes nitrogenados no solo representa un costo económico, también representa un riesgo ambiental, debido a que puede llegar a contaminar cuerpos acuáticos, reaccionar con oxígeno atmosférico para formar gases de efecto invernadero, entre otros efectos. Con esto en cuenta, el estudio presentado pretende presentar un protocolo para mejorar la capacidad fijadora de nitrógeno en especies bacterianas, mediante radiación UV. De esta forma, sería posible reducir la carga de fertilizantes necesaria para alcanzar el rendimiento deseado en las plantaciones, siendo de beneficio económico para los agricultores y de beneficio ambiental, dado que se reduce la contaminación planteada previamente.

IV. Objetivos

A. General

- Desarrollar un protocolo para evaluar el efecto de la mutagénesis aleatoria basada en radiación UV sobre la capacidad fijadora de nitrógeno de *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Lysinibacillus sphaericus*.

B. Específicos

- Elaborar una curva de supervivencia que permita determinar el tiempo máximo de exposición para *K. oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *L. sphaericus* que permita la obtención de mutantes viables.
- Cuantificar el amonio producido por los mutantes de *K. oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *L. sphaericus* evaluados tras el protocolo de mutagénesis desarrollado, para validar el mismo.
- Determinar el tamaño del efecto de la especie bacteriana y del tiempo de exposición a radiación UV bajo las condiciones utilizadas, sobre la cantidad de amonio producido por los pools de *K. oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *L. sphaericus* evaluados.

V. Hipótesis

Hi: El protocolo desarrollado permite determinar el porcentaje de supervivencia y la capacidad fijadora de nitrógeno de bacterias Gram positivas y Gram negativas tras utilizar radiación UV para inducir mutaciones aleatorias.

Ho: El planteamiento del protocolo no permite determinar el porcentaje de supervivencia post irradiación de las bacterias evaluadas.

Ha: El planteamiento del protocolo permite determinar el porcentaje de supervivencia post irradiación de las bacterias evaluadas.

Ho: No se obtendrán bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno mejorada tras los ensayos de mutagénesis aleatoria planteados en el protocolo.

Ha: Se obtendrá al menos una bacteria con capacidad fijadora de nitrógeno mejorada tras los ensayos de mutagénesis aleatoria planteados en el protocolo.

VI. Marco teórico

A. Importancia fisiológica del nitrógeno en las plantas

El nitrógeno es requerido por las plantas a nivel fisiológico dado que es parte esencial de bases nitrogenadas, aminoácidos, fitohormonas, auxinas, citocinas, entre otras moléculas necesarias para el crecimiento y desarrollo del organismo (Kirkby, *et al.*, 2009). También es necesario para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis, dado que las enzimas fotosintéticas requieren del elemento en cuestión para su síntesis. Además, el nitrógeno forma parte estructural de la molécula de clorofila, siendo 4 los átomos de este elemento los que interactúan con el átomo central del cofactor, magnesio, como se aprecia en la Figura 1. Adicionalmente, de este depende tanto el número como el tamaño de los cloroplastos (Bassi, *et al.*, 2018)(Li, *et al.*, 2013).

A pesar de que el nitrógeno representa aproximadamente el 78% de los gases presentes en la atmósfera, este se encuentra en forma de nitrógeno molecular (N_2) (Trenberth y Guillemot, 1994). Las plantas no tienen los mecanismos necesarios para captar y utilizar este nitrógeno de forma directa (Xin, *et al.*, 2014). Ante esta problemática, las plantas dependen de factores externos para la adquisición del nutriente.

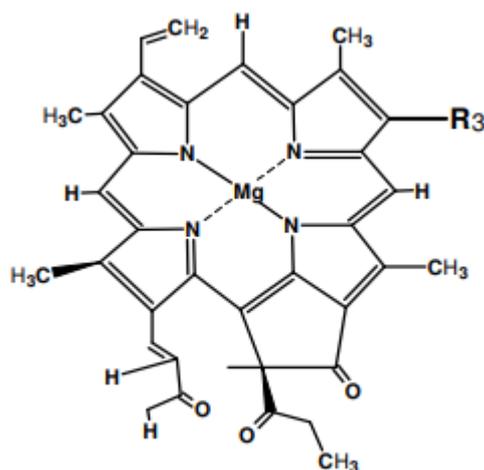


Figura 1. Estructura general de la clorofila. Nótese la presencia de 4 átomos de nitrógeno en la parte central de la molécula (İnanç, 2011).

B. Suplementación artificial de nitrógeno

Ante la falta de capacidad por parte de las plantas para hacer uso de nitrógeno atmosférico, la solución más común es la suplementación mediante fertilizantes. Para el 2020, en Guatemala, se hacían uso de 211,385.58 toneladas de fertilizante nitrogenado, comparado a las 9,035 toneladas de dicho fertilizante utilizadas en 1961

(Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2022). Para el 2003, únicamente el cultivo de caña de azúcar representaba el uso de aproximadamente 11,000 toneladas de fertilizante para suplir la necesidad de nitrógeno de dicho cultivo en territorio guatemalteco (Pérez, *et al.*, 2003). Para el caso del café, por cada hectárea de cultivo se requieren 0.13 toneladas de nitrógeno para la producción de entre 50 y 100 quintales de fruto maduro; para el 2012, eran 276,000 hectáreas las ocupadas por el cultivo de café, representando un total de 35,750 toneladas de fertilizante a nivel nacional (Rodas, 2021) (Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación [MAGA], 2012).

Entre el 50 y 70% del nitrógeno suministrado no es convertido o capturado (Hodge, *et al.*, 2000). El nitrógeno residual causa la contaminación de suelo, agua y aire. La contaminación sobre cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos se da al movilizarse el fertilizante mediante lixiviación, erosión y/o escorrentía hacia estos, dando paso a procesos de eutrofización y acidificación (Zhang, *et al.*, 2021)(Martinez, *et al.*, 2021)(Gilette, *et al.*, 2018). Su volatilización da paso a la formación de N₂O, representando esta vía al menos el 60% de la producción antropogénica de dicho gas de efecto invernadero (Martinez, *et al.*, 2021)(Gilette, *et al.*, 2018) .

El fertilizante nitrógeno residual también puede promover la mineralización de la materia orgánica del suelo. Consecuentemente, se ha evidenciado que la sustentabilidad de los cultivos se ve reducida (Mahal, *et al.*, 2019). Esto lleva, por lo tanto, a una reducción en la productividad de los cultivos. En ciertos cultivos, la administración excesiva de nitrógeno puede llevar a retrasos en la madurez del cultivo y, por lo tanto, en la cosecha (Howard, *et al.*, 2001).

C. Bacterias de la rizosfera y su importancia

De forma natural, el crecimiento de plantas de suelo es facilitado por comunidades de microorganismos asociadas a ellas. La rizosfera representa las partes de suelo en las cuales se tiene una interacción entre la raíz de las plantas y dichas comunidades (Souza, *et al.*, 2015). Dentro de los microorganismos encontrados en este espacio, se tienen las denominadas Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPB, por sus siglas en inglés). Dichas bacterias ayudan al crecimiento de las plantas y les brindan protección frente a agentes exógenos (Backer, *et al.*, 2018).

Dentro de los mecanismos por los que las PGPB contribuyen al crecimiento de las plantas se tiene la adquisición de nutrientes. Esto se lleva a cabo de distintas maneras, que incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de sideróforos, entre otras, como representado en la Figura 2 (Wang, *et al.*, 2022) (Suleman, *et al.*, 2018) (Aasfar, *et al.*, 2021). Se tiene también la protección frente a condiciones de estrés. Dentro de las maneras por las que este segundo mecanismo es llevado a cabo se tiene la modulación de integridad membranal, señalización mediada por fitohormonas, acumulación de osmolitos, entre otras (Backer, *et al.*, 2018)(Li, *et al.*, 2013).

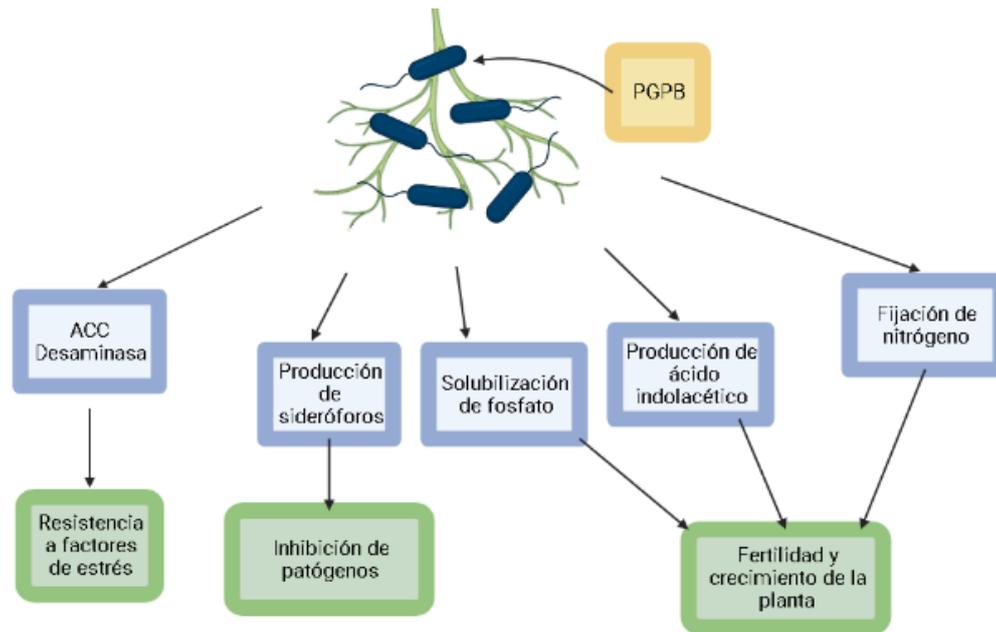


Figura 2. Mecanismos por los cuales las PGPB contribuyen al aumento de la productividad en cultivos. Dentro de estos se incluye la fijación biológica de nitrógeno.

Adaptado de (Souza, *et al.*, 2015)

A nivel comercial, las PGPB son importantes pues tienen la capacidad de mejorar la productividad agrícola (Katsenios, *et al.*, 2022). Más que una opción, el mejorar el rendimiento de cultivos de forma sostenible es una necesidad, debido a la creciente demanda ocasionada por un alza en la población a nivel mundial y en los precios de los fertilizantes, siendo que en el caso del fertilizante nitrogenado basado en urea se ha casi cuadruplicado el precio entre enero de 2017 y enero de 2022 (Schmidhuber, 2022). Además, el uso de estas bacterias ha sido propuesto como una alternativa al uso de químicos en la industria agrícola, dando paso a una agricultura sustentable, acompañada de los beneficios descritos previamente (Shah, *et al.*, 2021).

D. Captación y asimilación de nitrógeno

Para poder obtener nitrógeno, las plantas dependen de que este se encuentre en formas inorgánicas capturables, como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) u orgánicas, como urea y aminoácidos (Glass, 2009). Ante la presencia de nitrógeno en una de dichas formas, la planta modula la actividad receptora de nitrógeno y la arquitectura del sistema de raíces (Fernando, *et al.*, 2021). La recepción de nitrógeno se da por flujo másico o difusión (Kirkby, 2009) (Muratore, *et al.*, 2021).

En presencia de una forma capturable de nitrógeno, la planta expresa sistemas de transporte. Existen dos principales clasificaciones para dichos sistemas. Los sistemas de transporte de baja afinidad (LATS, por sus siglas en inglés) se expresan cuando el nitrógeno está disponible de forma abundante. En contraparte, los sistemas de transporte de alta afinidad (HATS, por sus siglas en inglés) se expresan cuando la disponibilidad de nitrógeno es limitada (Kumar, *et al.*, 2022). Dentro de las proteínas involucradas en estos sistemas destacan los transportadores y los transeptores. Los transeptores son moléculas que actúan tanto para la detección del nitrógeno como para su transporte, siendo NRT1.1, transeptor de NO_3^- , uno de los ejemplos más estudiados (Bouguyon,

et al., 2015). Por su parte, los transportadores se encargan de ingresar el nitrógeno a la planta y posteriormente distribuirlo (Fan, *et al.*, 2017).

Una vez ha ingresado a las células de la raíz, el nitrógeno puede ser metabolizado a nivel local, almacenado en vacuolas o transportado al resto del organismo. El transporte al resto del organismo se da mediante la corriente del xilema. Una vez en la parte aérea de la planta, el transporte puede involucrar también al floema (Krapp, 2015). En cuanto a su metabolismo, el nitrógeno inorgánico que ingresó a la planta debe ser convertido en aminoácidos, en un proceso denominado como asimilación, por su parte, la urea debe ser hidrolizada a forma inorgánica y luego darse el proceso mencionado (Krapp, 2014).

En el caso del NO_3^- , el proceso de asimilación involucra la acción de la nitrato reductasa, para llevar a cabo la transformación de nitrato en nitrito. El nitrito es posteriormente transformado en NH_4^+ por la nitrito reductasa. Finalmente, el NH_4^+ es transformado en glutarato por medio de la glutamina sintetasa o de la glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa. Finalmente, el glutamato puede ser convertido en otros aminoácidos por reacciones de transaminación, como se aprecia en la Figura 3 (Krapp, 2015).

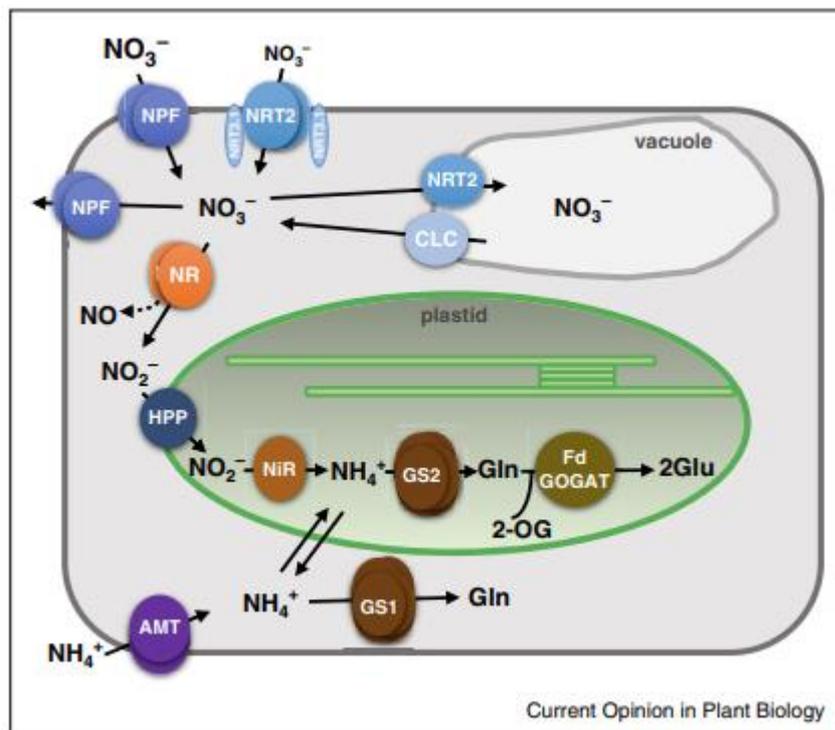


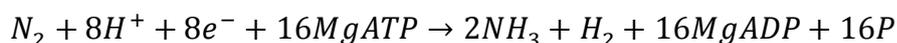
Figura 3. Asimilación y metabolismo de NO_3^- y NH_4^+ . El nitrógeno disponible en estas formas es metabolizado o almacenado. (Lindström y Mousavi, 2019).

E. Fijación biológica de nitrógeno por bacterias diazótroficas

Las bacterias diazótroficas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Dicho proceso es mediado por el complejo nitrogenasa, el cual tiene nitrógeno atmosférico (N_2) como sustrato, para dar amoníaco (NH_3) como producto (Mahmud, *et al.*, 2020). Bajo condiciones ácidas en el suelo, el amoníaco se protona para formar NH_4^+ (Latifah, *et al.*, 2011). Por su parte, el NH_3 puede ser oxidado a NO_2^- y este a NO_3^- , en un proceso

mediado por bacterias con las enzimas para llevar a cabo dichas reacciones (van Kessel, *et al.*, 2015).

El complejo nitrogenasa es codificado por los genes *nif* y requiere de un cofactor molibdeno-hierro para su activación. A pesar de que estos genes son comunes para las bacterias diazotrofas, su expresión, organización y regulación es variable (Dai, *et al.*, 2014) (Lie, *et al.*, 2022).



Ecuación 1. Reacción de fijación de nitrógeno atmosférico por parte del complejo nitrogenasa (Mahmud, *et al.*, 2020).

En el caso de *Klebsiella oxytoca*, esta especie posee 20 genes involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno. El proceso es regulado a nivel transcripcional, ante cambios ambientales. El clúster de genes en cuestión presenta una organización compleja, con elementos regulatorios como estructuras secundarias o promotores internos (Temme, *et al.*, 2012). Uno de los principales reguladores es el operón *nifLA*, que controla la expresión del gen *nifA* (cuyo producto, nifA, es una proteína de unión a enhancer que activa la transcripción del resto de genes *nif*) y *nifL* (cuyo producto, nifL, es inhibidor de *nifA*). Esta regulación es dada por fuentes externas de nitrógeno, nitrógeno fijado, presencia de oxígeno y la temperatura. En presencia de las condiciones adecuadas, se produce nifL, lo cual inhibe a *nifA* y hace que no sea posible la fijación de nitrógeno (Govantes, *et al.*, 1998) (Martínez, *et al.*, 2004).

Se ha reportado, en otra especie del género *Klebsiella*, que mutaciones en el gen *nifA* le brindan a cepas que no fijan nitrógeno de forma constitutiva la capacidad de hacerlo, mediante la activación del cluster de genes *nif* (Sibold y Elmerich, 1982). Otra mutación importante en el proceso de fijación del nitrógeno por parte de *K. pneumoniae* es la ausencia del gen *nifQ*, el cual participa en la síntesis del cofactor molibdeno-hierro. En caso de una delección del gen *nifQ*, la bacteria es incapaz de fijar nitrógeno, a menos de que el cofactor sea suministrado en el medio de cultivo (Imperial, *et al.*, 1984).



Figura 4. Representación esquemática de un fragmento del operón *nifLA* en *K. pneumoniae*. Subrayada, se encuentra la secuencia Shine-Dalgarno del gen *nifA*, la cual se encuentra superpuesta en la secuencia del gen *nifL*. En negrita, se tiene la secuencia que contiene tanto al codón *stop* de *nifL* como al codón *start* de *nifA*, dado que se encuentran traslapados (Govantes, 1998)(Drummond y Wootton, 1987). Para el caso de *K. oxytoca*, Arnold y colaboradores (1988) reportaron que la secuencia de *nifA* en dicha especie es idéntica a la encontrada en *K. pneumoniae* por Drummond y colaboradores (1986). En cuanto a *nifL*, se ha reportado que la secuencia puede variar, al menos, entre 2 y 7 aminoácidos. (Arnold, *et al.*, 1988).

En el caso de *Lysinibacillus sphaericus*, se ha reportado que hay cepas fijadoras de nitrógeno. La secuenciación del genoma de ciertas cepas de *L. sphaericus* ha

permitido identificar que contiene los genes *nifA* y *nifU*. Originalmente, la ausencia de otros genes *nif* han llevado a plantear que este género posee un sistema nitrogenasa distinto al del complejo nitrogenasa. En 2018, se confirmó la presencia del gen *nifH*, utilizado para confirmar la diazotrofia de la bacteria (Martínez y Dussan, 2017)(Shabanamol, et al., 2018).

Para *P. aeruginosa*, su potencial beneficio para los cultivos ha sido descrito previamente. Se ha determinado como antagonista para *Colletotrichum falcatum*, agente causal de la podredumbre roja (Viswanathan, et al., 2003). Se ha demostrado la capacidad fijadora de nitrógeno de *P. aeruginosa*; por ejemplo, para la cepa FG106 aislada a partir de raíces de tomate; un borrador del genoma de dicha cepa reveló la presencia de genes involucrados en el metabolismo de nitrógeno (Ghadamgahi, et al., 2022). Para la cepa PA7, se encuentra descrita la ruta de fijación de nitrógeno, que involucra los genes *nifD*, *nifK*, *nifH*, en adición a genes correspondientes a nitrogenasas alternas (*anfG*, *vnfD*, *vnfK*, *vnfG*, *vnfH*) (Kanehis Laboratories, 2021).

F. Mutagénesis inducida por radiación Ultravioleta (UV)

A pesar de que la aparición de mutaciones en el genoma bacteriano es un proceso espontáneo, dado por factores intrínsecos como los errores a los que las polimerasas encargadas de la replicación son propensas, el proceso puede ser acelerado por acción de agentes exógenos (Krishna, 2007). La radiación UV es uno de los agentes exógenos capaces de causar mutaciones en el genoma de las bacterias. El principal mecanismo por el que dicho proceso es llevado a cabo es mediante la inducción de la formación de dímeros de pirimidinas, en forma de ciclobutanos y de fotoproductos 6-4 (Vechtomova, et al., 2021). En comparación, los fotoproductos 6-4 son menos mutagénicos dado que son reparados con mayor facilidad (Chandrasekhar y Van Houten, 2000).

Las mutaciones generadas llevan a efectos como cambios en el marco de lectura, deleciones, sustituciones de bases. Estos impactan el proceso de replicación, dando lugar a generaciones descendientes mutadas (Shibai, 2017). Un factor importante a tomar en consideración para este proceso es la dosis de radiación administrada, dado que este parámetro afecta tanto la supervivencia de la célula como su capacidad para replicarse y su mutabilidad. Tras la inducción del daño por radiación UV, se activa la respuesta SOS y las vías de reparación bacterianas, con el fin de corregir el daño generado (Bates, et al., 1989) (Krishna, 2007).

En bacterias, los dímeros de pirimidina pueden ser reparados de forma específica por la ADN fotoliasa. Esta enzima se une a los dímeros y repara la mutación mediante una serie de reacciones de transferencia de electrones (Zhang, et al., 2017). De forma general, esta mutación es arreglada mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos, mediante una escinucleasa (Moolenaar, et al., 2000). La cafeína es una de las moléculas que puede aumentar la mutagenicidad de la radiación UV. Esto se da ya que impide que la ADN fotoliasa se una de forma específica al dímero de pirimidina formado y promueve la unión inespecífica de la escinucleasa a la región de ADN que contiene los nucleótidos dimerizados (Selby y Sancar, 1990) (Chung, 2021)(Majumdar y Chandra, 1985). Para daños de doble hebra, se hace uso del mecanismo de recombinación homóloga, siendo la cafeína capaz de degradar nucleasas que intervienen en dicho proceso y de promover la generación de estructuras que impiden la reparación de la mutación (Chung, 2021) (Tsabar, et al., 2015).

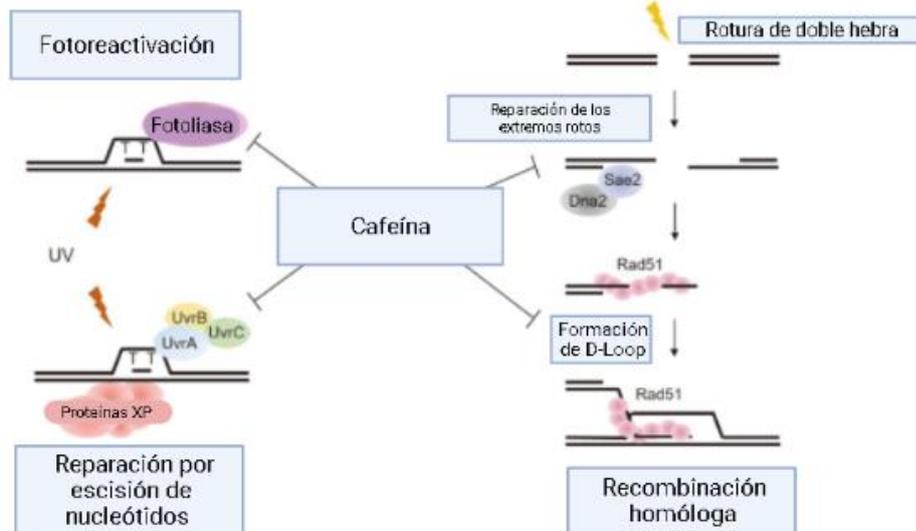


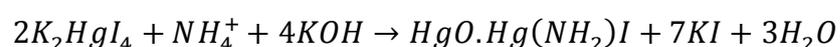
Figura 5. Mecanismos por los cuales la cafeína inhibe la reparación de mutaciones. Adaptado de (Chung, 2021)

El uso de radiación UV como agente mutagénico es de conveniencia económica, tanto por la facilidad para conseguir fuentes que la emitan como por su manejo simple. Esta radiación es utilizada también como agente desinfectante, dado que la exposición prolongada de bacterias a esta resulta en su muerte. La longitud de onda más común en los equipos en cuestión es de 254nm, entrando en el rango de la UVC. Esta longitud de onda se encuentra cerca del pico de absorción de radiación UV del ADN (260nm) y da paso a fotoproductos que afectan la supervivencia de la célula, siendo los dímeros mencionados previamente los principales (Coohill y Sagripanti, 2008)(Shibai, 2017).

G. Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno

Para identificar la capacidad diazótrofa de las bacterias, es necesario el uso de un medio de cultivo libre de nitrógeno. Ejemplo de los medios para dicho fin, se tiene el medio *New Fabian Broth* (NFb) y el medio mínimo libre de nitrógeno de Burk (Rodrigues, *et al.*, 2018). El medio NFb contiene ácido málico como fuente de carbono y dentro de su composición destaca la presencia de molibdato de sodio, teniendo en consideración que el complejo nitrogenasa requiere molibdeno como cofactor (Baldani, *et al.*, 2013). Por su parte, el medio mínimo libre de nitrógeno de Burk cuenta con sacarosa como fuente de carbono y para el cofactor, cuenta igualmente con molibdato de sodio, en adición a cloruro de hierro (III), siendo hierro el otro elemento que conforma al cofactor requerido por el complejo nitrogenasa (Stella y Suhaimi, 2010).

Para confirmar la presencia de amonio en el medio, puede hacerse uso del reactivo de Nessler (Jeong, *et al.*, 2013). Este consiste en tetrayodomercuriato (II) de potasio (National Center for Biotechnology Information, 2022). En medio básico, reacciona con el amonio para dar paso a la formación de un complejo de coloración café rojizo (Zhao, *et al.*, 2019).



Ecuación 2. Reacción de reactivo de Nessler en presencia de amonio. El compuesto $HgO \cdot Hg(NH_2)I$ se manifiesta en forma de precipitado café.

Modificado de (Zhao, *et al.*, 2019)

VII. Metodología

A. Obtención de las cepas de trabajo

- Se utilizó la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus*, aislada por Heredia (2019).
- Se utilizó la cepa 86 de *K. oxytoca* aislada por MOSCAMED (datos no publicados).
- Se utilizó una cepa de laboratorio de *P. aeruginosa*, preservada en el departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

B. Determinación de condiciones de supervivencia post-irradiación

1. Pruebas con cambio en densidad óptica

- Se preparó un estándar McFarland 0.5 a partir de un cultivo de 24 horas para las especies evaluadas.
- Se preparó diluciones seriadas, con solución salina al 0.9%, hasta llegar a soluciones de 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL.
- Se inoculó en una placa de 96 pozos con solución salina al 0.9%, dejando las columnas 1 y 12 y las filas A y H con medio sin inocular y pozos control.
- Se incubó por 48 horas a 35°C.
- Se evaluó los cambios en la densidad óptica (OD).
- Se identificó que los cambios en el OD eran muy bajos.
- Se sustituyó la solución salina por caldo nutritivo.
- Se detectó que en los pozos control había cambios no esperados en el OD.
- Se descartó la metodología.

2. Pruebas con vertido en placa

- Se planteó inocular diluciones y sembrar por vertido en placa con agar nutritivo.
- Se descartó la propuesta debido a la dificultad para aislar las colonias en crecimiento.
- Se descartó la propuesta ya que se consideró que, al aislar y trasladar las colonias al medio selectivo, podría arrastrarse parte del agar nutritivo, representando una fuente de nitrógeno no deseada.

3. Pruebas con dispersión del inóculo

- Se preparó un estándar McFarland 0.5 a partir de un cultivo de 24 horas para todas las especies.
- Se preparó diluciones seriadas hasta llegar a soluciones de 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL.
- Se sirvió 10, 50 y 100uL de las diluciones de 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL, respectivamente en una placa petri con agar nutritivo (Criterion). El proceso se repitió en triplicado para cada tiempo de exposición (0, 5 y 10 segundos).
- Se cargó las placas en la cabina de descontaminación UV (prototipo de cámara UVGi P001 Serproma), de forma individual.
- Se administró radiación UV por el tiempo especificado.
- Se protegió las muestras de la luz directa tras la irradiación

- Se incubó por 24 horas.
- Se realizó el conteo de colonias formadas en el caso de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* y se revisó para la presencia u ausencia de crecimiento en el caso de *L. sphaericus*.
- Se obtuvo, para *K. pneumoniae* y para *P. aeruginosa*, el % de recuperación a partir del número de colonias esperado.
- Se almacenó las muestras a 4°C.

C. Reducción del intervalo de exposición a radiación UV

- Se redujo el intervalo de tiempo a muestrear (0, 1, 2, 3, 4 y 5s), a partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior.
- Se repitió el proceso planteado previamente con los tiempos de exposición mencionados, utilizando una concentración de inóculo de 10^3 UFC/mL.
- Se almacenó las muestras a 4°C.

D. Screening para identificar bacterias fijadoras de nitrógeno

- Se preparó medio Burk, con base en la siguiente composición (1L): 0.200g $MgSO_4$ (Merck), 0.8g K_2HPO_4 (Merck), 0.2g KH_2PO_4 (Merck), 0.00145g $FeCl_3$ (Merck), 20g sucrosa (Merck), 0.001g Na_2MoO_4 (Merck), 0.130g $CaSO_4$ (Merck).
- Se preparó un segundo lote de medio Burk (1L), agregando 3.0g de cafeína (0.3%).
- Se llenó los pozos de una microplaca de 96 pozos con 200uL del medio Burk preparado.
- Se dejó las filas A y H y las columnas 1 y 12 sin inocular, para prevenir el efecto de borde.
- Se inocularon cada pozo individual con los mutantes generados y con bacterias sin irradiar, a manera de control.
- Se incubó por 72 horas.
- Se adicionaron 100uL de reactivo de Nessler a cada pozo
- Se buscó una coloración café/anaranjado (positivo) o amarilla (negativo) tras 10 minutos de la adición del reactivo.
- Se identificó los mutantes con un resultado positivo.
- Se almacenó los mutantes con resultado positivo a 4°C.

E. Cuantificación de nitrógeno fijado

- Se preparó una solución stock de cloruro de amonio de 20ug/mL.
- Se cargó por triplicado en la microplaca de 96 pozos.
- Se diluyó de forma vertical acorde al mapa, siendo el volumen final de cada pozo de 200uL.
- Se añadieron 200uL de medio Burk con cloruro de amonio a la microplaca de 96 pozos acorde al mapa.
- Se cargaron las cepas que mostraron una potencial actividad fijadora de nitrógeno con concentración inicial de 1×10^8 UFC/mL (estándar McFarland 0.5), como indicado en el mapa.
- Se diluyó de forma vertical, acorde al mapa, siendo el volumen final de cada pozo de 200uL.
- Se añadió reactivo de Nessler (100uL) y se obtuvo la absorbancia a 425nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl
B	Bl	20ug/ mL	20ug/ mL	20ug/ mL	Muta nte 1 10 ⁸	Muta nte 1 10 ⁸	Muta nte 1 10 ⁸	Muta nte 2 10 ⁸	Muta nte 2 10 ⁸	Muta nte 2 10 ⁸	C-	Bl
C	Bl	10ug/ mL	10ug/ mL	10ug/ mL	Muta nte 1 10 ⁷	Muta nte 1 10 ⁷	Muta nte 1 10 ⁷	Muta nte 2 10 ⁷	Muta nte 2 10 ⁷	Muta nte 2 10 ⁷	C-	Bl
D	Bl	5ug/ mL	5ug/ mL	5ug/ mL	Muta nte 1 10 ⁶	Muta nte 1 10 ⁶	Muta nte 1 10 ⁶	Muta nte 2 10 ⁶	Muta nte 2 10 ⁶	Muta nte 2 10 ⁶	C-	Bl
E	Bl	2.5ug /mL	2.5ug /mL	2.5ug /mL	Muta nte 1 10 ⁵	Muta nte 1 10 ⁵	Muta nte 1 10 ⁵	Muta nte 2 10 ⁵	Muta nte 2 10 ⁵	Muta nte 2 10 ⁵	C-	Bl
F	Bl	1.25u g/mL	1.25u g/mL	1.25u g/mL	Muta nte 1 10 ⁴	Muta nte 1 10 ⁴	Muta nte 1 10 ⁴	Muta nte 2 10 ⁴	Muta nte 2 10 ⁴	Muta nte 2 10 ⁴	C-	Bl
G	Bl	0.625 ug/m L	0.625 ug/m L	0.625 ug/m L	Muta nte 1 10 ³	Muta nte 1 10 ³	Muta nte 1 10 ³	Muta nte 2 10 ³	Muta nte 2 10 ³	Muta nte 2 10 ³	C-	Bl
H	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl
B	Bl	20ug/ mL	20ug/ mL	20ug/ mL	Muta nte 3 10 ⁸	Muta nte 3 10 ⁸	Muta nte 3 10 ⁸	Muta nte 4 10 ⁸	Muta nte 4 10 ⁸	Muta nte 4 10 ⁸	C-	Bl
C	Bl	10ug/ mL	10ug/ mL	10ug/ mL	Muta nte 3 10 ⁷	Muta nte 3 10 ⁷	Muta nte 3 10 ⁷	Muta nte 4 10 ⁷	Muta nte 4 10 ⁷	Muta nte 4 10 ⁷	C-	Bl
D	Bl	5ug/ mL	5ug/ mL	5ug/ mL	Muta nte 3 10 ⁶	Muta nte 3 10 ⁶	Muta nte 3 10 ⁶	Muta nte 4 10 ⁶	Muta nte 4 10 ⁶	Muta nte 4 10 ⁶	C-	Bl
E	Bl	2.5ug /mL	2.5ug /mL	2.5ug /mL	Muta nte 3 10 ⁵	Muta nte 3 10 ⁵	Muta nte 3 10 ⁵	Muta nte 4 10 ⁵	Muta nte 4 10 ⁵	Muta nte 4 10 ⁵	C-	Bl
F	Bl	1.25u g/mL	1.25u g/mL	1.25u g/mL	Muta nte 3 10 ⁴	Muta nte 3 10 ⁴	Muta nte 3 10 ⁴	Muta nte 4 10 ⁴	Muta nte 4 10 ⁴	Muta nte 4 10 ⁴	C-	Bl
G	Bl	0.625 ug/m L	0.625 ug/m L	0.625 ug/m L	Muta nte 3 10 ³	Muta nte 3 10 ³	Muta nte 3 10 ³	Muta nte 4 10 ³	Muta nte 4 10 ³	Muta nte 4 10 ³	C-	Bl
H	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl

Bl: Blanco

C-: Control negativo

- Se incubó por 72 horas
- Se añadieron 100uL de reactivo de Nessler a cada pozo
- Se obtuvo la absorbancia a 425nm con un lector de microplaca.
- Se determinó que ningún pozo mostraba el cambio de coloración de interés.
- Se repitió el proceso, con medio Burk con cafeína al 0.3%.
- Se determinó que ningún pozo mostraba el cambio de coloración de interés.

F. Modificaciones al protocolo tras ausencia de resultados de interés

- Se preparó un nuevo lote de medio Burk, aumentando la concentración de cafeína a 0.6%.
- Se preparó diluciones de 1×10^3 UFC/mL para *K. oxytoca* y 1×10^5 UFC/mL para *L. sphaericus*
- Se sirvió 50uL de los inóculos preparados en una placa con agar nutritivo y se dispersó el volumen.
- Se realizó una nueva ronda de mutagénesis con exposiciones de 3 y 4 segundos para *K. oxytoca* y *L. sphaericus*.
- Se incubó por 48 horas a 35°C
- Se crearon *pools* conformados por una muestra de cada colonia crecida en las placas individuales, inoculadas en 500uL del medio Burk con cafeína al 0.6%.
- Se inoculó el medio Burk con los *pools* de la siguiente manera, en una placa de 96 pozos:

SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
SM	C-	K11	K31	K51	K71	K91					SM
SM	C-	K12	K32	K52	K72	K92					SM
SM	C-	K13	K33	K53	K73	K93					SM
SM	K01	K21	K41	K61	K81	K101					SM
SM	K02	K22	K42	K62	K82	K102					SM
SM	K03	K23	K43	K63	K83	K103					SM
SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM

SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
SM	C-	L11	L31	L51	L71	L91					SM
SM	C-	L12	L32	L52	L72	L92					SM
SM	C-	L13	L33	L53	L73	L93					SM
SM	L01	L21	L41	L61	L81	L101					SM
SM	L02	L22	L42	L62	L82	L102					SM
SM	L03	L23	L43	L63	L83	L103					SM
SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM

SM: Pozos con agua ultrapura estéril

C-: Control negativo (medio Burk con cafeína al 0.6% sin inocular)

K: Medio Burk con cafeína al 0.6%, inoculado con la muestra correspondiente del pool de *K. oxytoca*

L: Medio Burk con cafeína al 0.6%, inoculado con la muestra correspondiente del pool de *L. sphaericus*.

- Se incubó por 48 horas a 35°C.
- Se adicionó 75uL de reactivo de nessler a los pozos con muestra y se midió la absorbancia a 425nm.
- Se cargó la placa con los estándares de cloruro de amonio, para que quedara de la siguiente manera, siendo las concentraciones indicadas (esc1: 20,000 ug/mL, esc2: 2,000 ug/mL, esc3: 200ug/mL, esc4: 20ug/mL, esc5: 2ug/mL y esc6: 0ug/m):

SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
SM	C-	K11	K31	K51	K71	K91		esc1	esc1	esc1	SM
SM	C-	K12	K32	K52	K72	K92		esc2	esc2	esc2	SM
SM	C-	K13	K33	K53	K73	K93		esc3	esc3	esc3	SM
SM	C-	K21	K41	K61	K81	K101		esc4	esc4	esc4	SM
SM	C-	K22	K42	K62	K82	K102		esc5	esc5	esc5	SM
SM	C-	K23	K43	K63	K83	K103		esc6	esc6	esc6	SM
SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM

SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
SM	C-	L11	L31	L51	L71	L91		esc1	esc1	esc1	SM
SM	C-	L12	L32	L52	L72	L92		esc2	esc2	esc2	SM
SM	C-	L13	L33	L53	L73	L93		esc3	esc3	esc3	SM
SM	C-	L21	L41	L61	L81	L101		esc4	esc4	esc4	SM
SM	C-	L22	L42	L62	L82	L102		esc5	esc5	esc5	SM
SM	C-	L23	L43	L63	L83	L103		esc6	esc6	esc6	SM
SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM

- Se añadieron 75uL de reactivo de Nessler a los pozos con los estándares.
- Se midió la absorbancia a 425nm.
- Se elaboró una curva de calibración a partir de los estándares de cloruro de amonio para determinar la concentración de amonio producido por cada muestra evaluada.
- Se analizó los datos obtenidos.

G. Análisis estadístico

- Se analizó los datos mediante el software RStudio 2021.09.1+372 "Ghost Orchid" Release, utilizando R versión 4.1.2 (2021-11-01).
- Se llevó a cabo la exploración de datos acorde al protocolo descrito en Zuur, Ieno y Elphick (2010).
- Se elaboró un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para analizar la estructura de proximidades en el conjunto de datos, mediante el paquete "Vegan".
- Se evaluó, previo a proponer los modelos, la colinealidad entre las variables predictoras propuestas, mediante HighstatLibV10, considerándose un coeficiente de correlación < 0.5 aceptable.
- Se evaluó, previo a proponer los modelos, el factor de inflación de varianza de cada variable, mediante HighstatLibV10, considerándose un valor < 3 para cada variable aceptable.
- Se determinó el tipo de modelo a utilizar para cada variable respuesta, acorde a la naturaleza de sus datos y la estructura de dependencia. Debido a que todos los mutantes provienen de una misma cepa, se decidió utilizar modelos con efectos aleatorios a nivel de muestra, para el caso de la determinación del tiempo de supervivencia, o de *pool*, para el caso de la cuantificación de amonio, que resuelvan la pseudoreplicación.
- Se elaboró, para determinar el efecto de la radiación UV sobre la supervivencia de las bacterias Gram negativas analizadas, un modelo lineal mixto generalizado (GLMM) con distribución de Poisson inflado con ceros y una función *log link*, para asegurar valores positivos en el ajuste del modelo. La distribución Poisson se eligió dado que es la utilizada para modelar datos de tipo conteo y se agregó la inflación por ceros ya que la distribución Poisson normal presentaba sobredispersión en el ajuste del modelo. Las variables fijas utilizadas fueron el tiempo de exposición a radiación UV (continua) y la especie (categórica con 2 niveles). La variable aleatoria utilizada fue el ID de cada placa analizada.
- Se elaboró, para determinar el efecto de la radiación UV sobre la presencia o ausencia de crecimiento de *L. sphaericus*, un modelo lineal mixto generalizado (GLMM) con distribución binomial y una función *log link*, para asegurar valores positivos en el ajuste del modelo. La distribución binomial se eligió dado que es la utilizada para modelar datos de tipo presencia/ausencia. Las variables fijas utilizadas fueron el tiempo de exposición a radiación UV (continua) y la especie (categórica con 2 niveles). La variable aleatoria utilizada fue el ID de cada placa analizada.
- Se elaboró, para determinar el efecto de la irradiación UV sobre la capacidad de los *pools* generados para producir amonio, un modelo lineal mixto con distribución gaussiana y una función *log link*, para asegurar valores positivos en el ajuste del modelo. La distribución gaussiana se eligió dada la naturaleza continua de la variable respuesta. Las variables fijas utilizadas fueron el tiempo de exposición a radiación UV (continua) y la especie (categórica con 2 niveles). La variable aleatoria utilizada fue el pool al que cada muestra pertenecía. Se tuvo que realizar una transformación logarítmica para que el modelo pudiera ser validado.
- Se propusó modelos con las variables por separado y un modelo nulo con la misma distribución para evaluar cual era el más parsimonioso para explicar los datos. El modelo más parsimonioso fue evaluado mediante el criterio de información de Akaike para muestras pequeñas (AICc), siendo considerados

aquellos modelos con un $\Delta AICc < 2$ igual de parsimoniosos. Los modelos fueron ajustados mediante el paquete “lme4”, exceptuando el modelo poisson inflado con ceros, el cual fue ajustado mediante el paquete “glmmTMB”.

- Se validó los modelos mediante un diagnóstico de residuales para modelos de regresión jerárquicos (multinivel/mixtos) (DHARMA), utilizando el paquete homónimo, considerándose validos aquellos modelos que aprobaron 4 de las 6 pruebas afectadas por dicho diagnóstico.
- Se evaluó, para el modelo poisson y binomial generados, la presencia de sobredispersión, mediante el paquete “performance”.

VIII. Resultados

A. Protocolo final

Se desarrolló, después de las pruebas y modificaciones descritas en la sección de metodología, la versión final del protocolo basado en radiación UV para la inducción de mutaciones aleatorias en bacterias Gram negativas y Gram positivas para una mejora en su capacidad fijadora de nitrógeno.

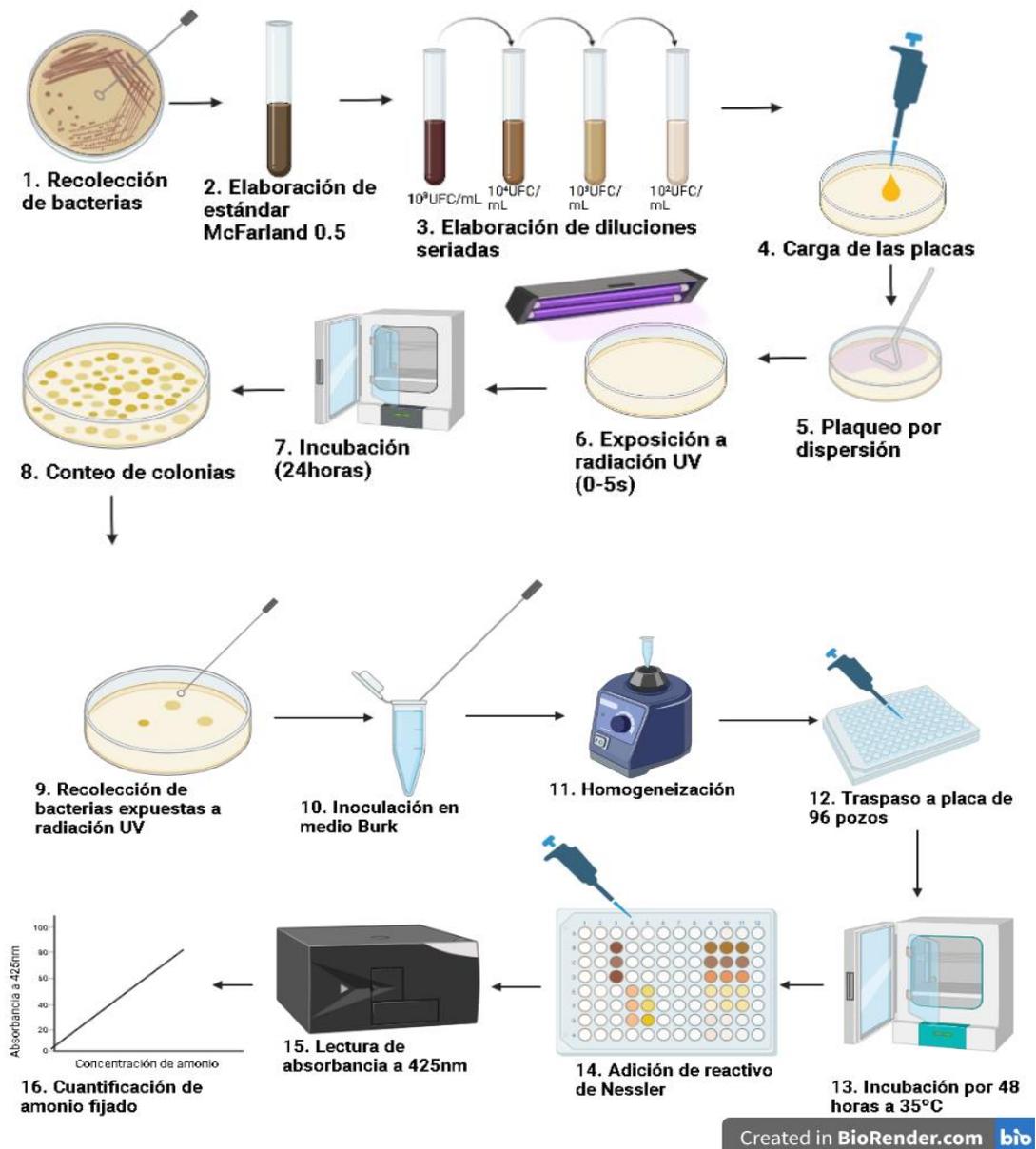


Figura 6. Protocolo final desarrollado para inducir mutaciones aleatorias mediante radiación UV a 425nm y evaluar su efecto sobre la capacidad productora de amonio de los mutantes evaluados.

B. Elaboración de curvas de supervivencia

La propuesta de utilizar la diferencia en densidad óptica con placas de 96 pozos se rechazó ya que al momento de incubar las placas, se originaron leves diferencias en el volumen del líquido inoculado en el pozo que causaron una diferencia en el OD no asociado al crecimiento bacteriano. Seguido, se intentó evaluar mediante la técnica de vertido en placa, sin embargo, esto representaba una complicación a la hora de recolectar las colonias y transferirlas al medio de selección de nitrógeno, pues se tenía el riesgo de que parte del medio nutritivo se transfiriera, representando una fuente de nitrógeno no deseada. Finalmente, se decidió evaluar la supervivencia bacteriana mediante la técnica de esparcido en placa. Para el caso de *L. sphaericus*, no fue posible obtener colonias aisladas, por lo que únicamente se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento tras la irradiación.

Se analizaron muestras de *K. oxytoca* y *P. aeruginosa* (n=36) para generar un modelo predictivo para explicar el efecto del tiempo y de la especie en la supervivencia de bacterias Gram negativas tras su irradiación a luz UV a 425nm mediante el prototipo de cámara UVGi P001 marca Serproma. Se obtuvo que tanto la especie como el tiempo de irradiación se incluyen en el modelo más parsimonioso para explicar dicha variable respuesta y ambos presentan un efecto claro. Para el caso del tiempo de exposición, el tamaño del efecto indica que, por cada segundo de irradiación, el porcentaje de supervivencia decrece en alrededor de un 65%. En cuanto al tamaño del efecto de la especie, se obtuvo que la radiación decrece la supervivencia aproximadamente un 38% más para *P. aeruginosa*, en comparación a *K. oxytoca*.

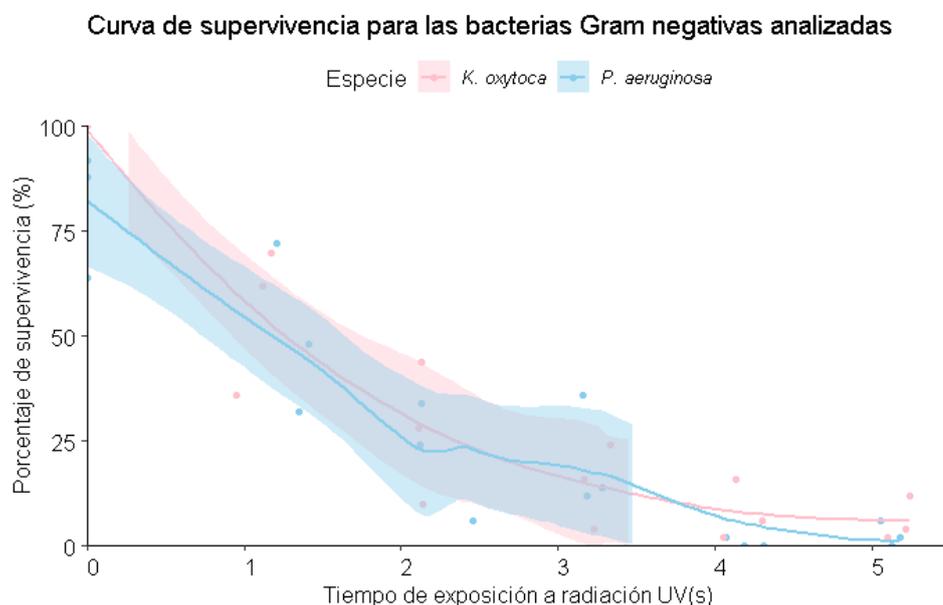


Figura 7. Curva de supervivencia elaborada para las bacterias Gram negativas analizadas tras exposición a radiación UV mediante prototipo de cámara UVGi P001 marca Serproma.

Se observa que el porcentaje de colonias sobrevivientes decrece en función del tiempo de forma consistente para ambas especies. Para los tiempos en los que el

intervalo de confianza del 95% pudo ser calculado con valores de supervivencia arriba de 0, estos parecen traslaparse para ambas especies.

Cuadro 1. Resumen de la selección del modelo linear mixto generalizado propuesto para predecir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas analizadas. Se incluye, para cada modelo candidato, el logaritmo de la verosimilitud (LogL), el valor del criterio de información de Akaike corregido para tamaños de muestra pequeños (AICc), el cambio en el valor de AICc (Δ AICc) y el peso del AICc (wAICc)

Modelo candidato	LogL	AICc	Δ AICc	wAICc
% de supervivencia				
% de supervivencia ~Especie + Tiempo de exposición a radiación UV	-131.300	274.6	0.00	0.656
% de supervivencia ~Tiempo de exposición a radiación UV	-133.302	275.9	1.29	0.344
% de supervivencia ~ Especie	-145.458	300.2	25.61	0.000
% de supervivencia ~ 1	-148.701	304.2	29.55	0.000

Nota: El ID de cada caja Petri evaluada fue utilizada como el efecto aleatorio en todos los modelos.

Se obtuvo que el modelo más parsimonioso es el que incluye tanto a la especie evaluada como el tiempo de exposición a la radiación UV para predecir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas analizadas.

Cuadro 2. Tamaño del efecto (β), error estándar (SE), limite inferior (LIC) y superior (LSC) del intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas.

Variable	β	SE	LIC	LSC
% de supervivencia				
Intercepto	4.58897	0.21445	4.1686453	5.009292593
Tiempo de exposición a radiación UV	-0.61831	0.07468	-0.7646659	-0.471945119
Especie	-0.11875	0.05942	-0.2352121	-0.002279239

Nota: Para el caso de especie, el nivel de referencia corresponde a *K. oxytoca*. Ambas variables explicativas presentan un efecto claro. Se utilizó el modelo completo para obtener un wAICc combinado de 1.

Para la variable de tiempo de exposición a radiación UV, se obtuvo que la variable presenta un efecto claro, negativo, sobre la supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas. De igual manera, la especie evaluada presenta un efecto claro, negativo, sobre dicha variable.

Para el caso del tiempo de supervivencia para *L. sphaericus*, se obtuvo de igual manera que la probabilidad de crecimiento de dicha especie se ve afectada por el tiempo

de exposición a radiación UV de forma negativa, como lo indica el tamaño de efecto para dicha variable en el Cuadro 4.

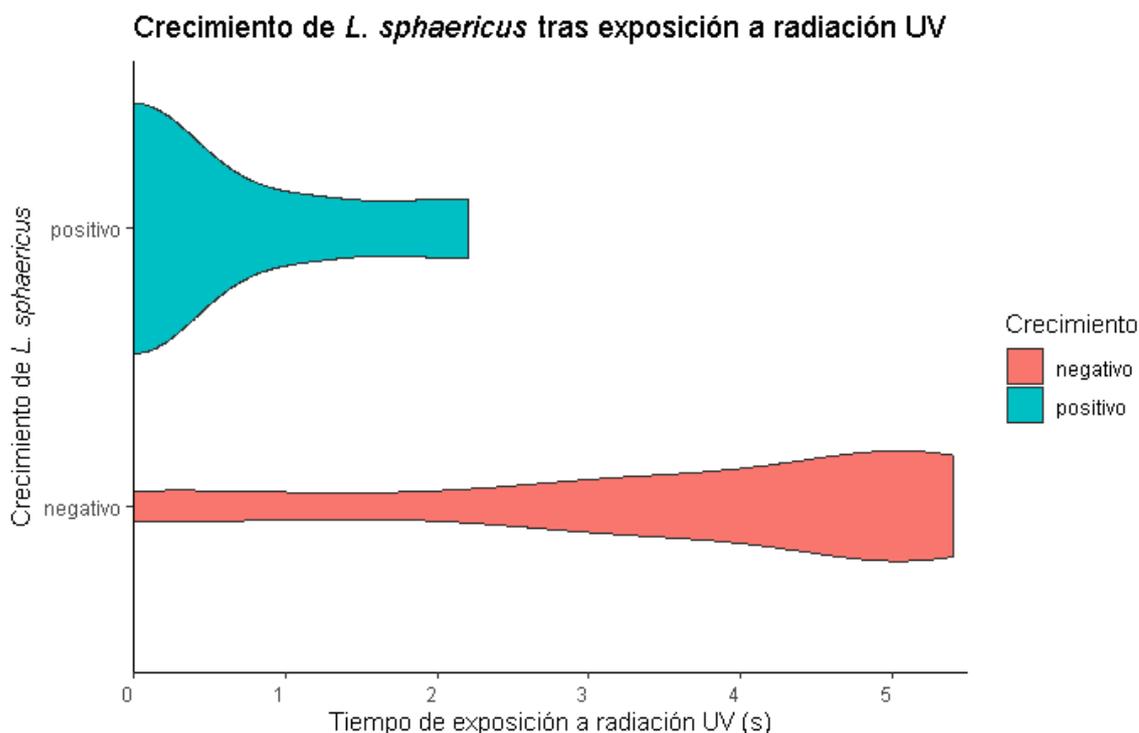


Figura 8. Diagrama de violín elaborado para el crecimiento de *L. sphaericus* tras exposición a radiación UV mediante prototipo de cámara UVGi P001 marca Serproma.

Se aprecia que la probabilidad de crecimiento positivo decrece en función del tiempo, mientras que aumenta para el caso de una ausencia de crecimiento. Se obtuvieron tiempos en los que es probable tanto un crecimiento positivo como uno negativo.

Cuadro 3. Resumen de la selección del modelo lineal mixto generalizado propuesto para explicar la presencia o ausencia de crecimiento de *L. sphaericus* en función del tiempo de exposición a radiación UV. Se incluye, para cada modelo candidato, el logaritmo de la verosimilitud (LogL), el valor del criterio de información de Akaike corregido para tamaños de muestra pequeños (AICc), el cambio en el valor de AICc ($\Delta AICc$) y el peso del AICc ($wAICc$)

Modelo candidato	LogL	AICc	$\Delta AICc$	$wAICc$
Presencia de crecimiento de <i>L. sphaericus</i>				
Crecimiento ~ Tiempo de exposición a radiación UV	-8.219	23.4	0.00	1
Crecimiento ~ 1	-20.527	45.5	22.14	0

Nota: El ID de cada caja Petri evaluada fue utilizada como el efecto aleatorio en todos los modelos.

Frente a un modelo nulo, el modelo que propone el tiempo de exposición a la radiación UV para predecir la presencia o ausencia de crecimiento de *L. sphaericus* es más parsimonioso y presenta un 100% de los datos que pueden ser explicados por los modelos propuestos.

Cuadro 4. Tamaño del efecto (β), error estándar (SE), límite inferior (LIC) y superior (LSC) del intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la presencia de crecimiento de *L. sphaericus*

Variable	β	SE	LIC	LSC
Presencia de crecimiento de <i>L. sphaericus</i>				
Intercepto	19.253	10.359	2.866906	*
Tiempo de exposición a radiación UV	-9.256	4.491	-31.082312	-2.082956

Nota: La variable presenta un efecto claro. El límite superior del intercepto no pudo ser calculado.

El tiempo de exposición a radiación UV presenta un efecto claro, negativo, sobre la supervivencia de *L. sphaericus*.

Para evaluar la cantidad de amonio producido por los *pools* de mutantes evaluados, se evaluaron 3 muestras de 22 *pools* distintos (n=66). El NMDS no parece mostrar diferencias tanto para el factor especie como el factor tiempo. Acorde a la selección de modelos presentada en el Cuadro 5, el modelo nulo es igual de parsimonioso que el modelo con la variable especie para explicar la variable respuesta y la variable especie no muestra un efecto claro sobre la capacidad del mutante para producir amonio, como se observa en el Cuadro 6.

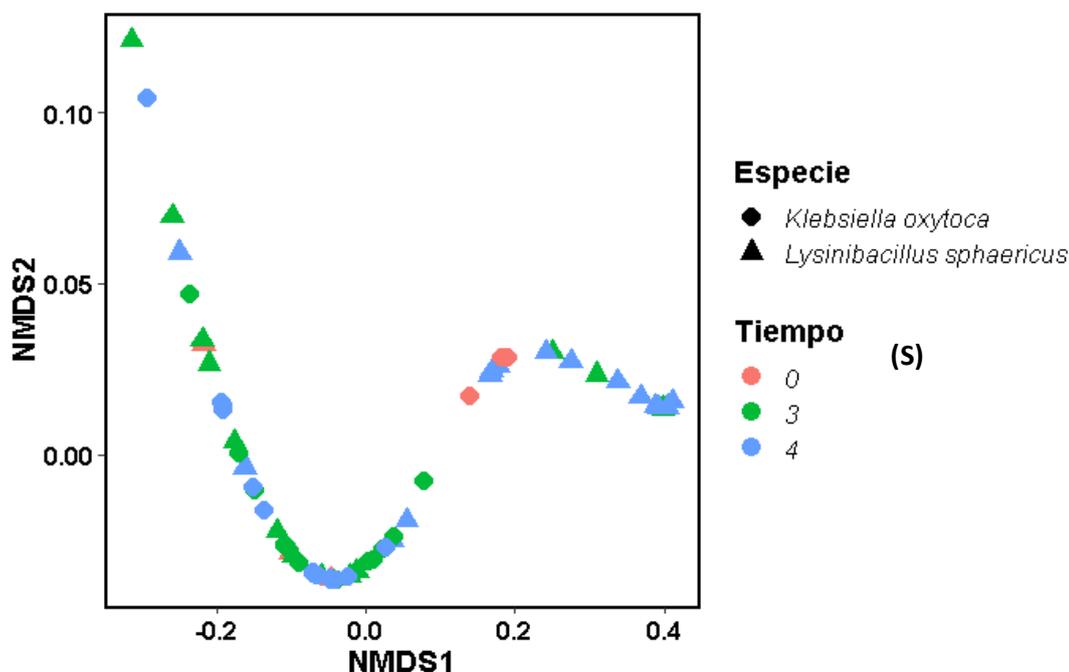


Figura 9. NMDS para evaluar las diferencias en la concentración de amonio producido tras 48 horas, acorde a las especies y tiempos evaluados.

Tras el análisis de escalamiento dimensional, no se aprecia la formación de grupos distintivos del resto de muestras evaluadas.

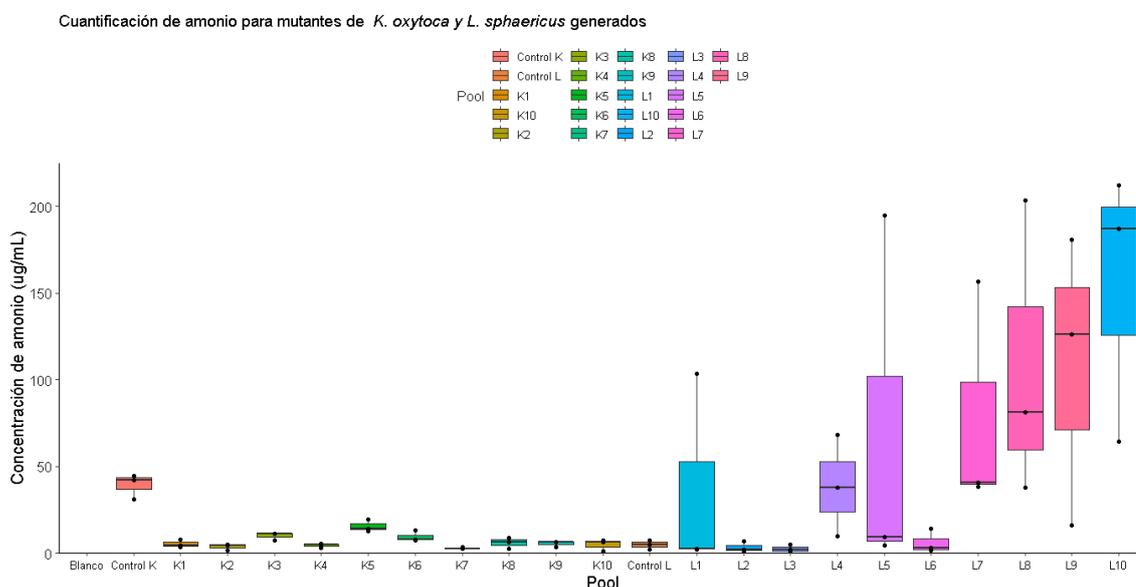


Figura 10. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de *K. oxytoca* y *L. sphaericus* generados tras su exposición a radiación UV.

Para ambas especies, los *pools* 1-5 fueron irradiados por 3 segundos y los *pools* 6-10 por 4 segundos, bajo las condiciones previamente descritas. Se obtuvo que los *pools* de *L. sphaericus* presentan, en la mayoría de casos, una mayor variabilidad en cuanto al amonio producido, en contraste a los *pools* de *K. oxytoca*.

Cuadro 5. Resumen de la selección del modelo lineal mixto propuesto para predecir la cantidad de amonio fijado por los *pools* mutantes generados. Se incluye, para cada modelo candidato, el logaritmo de la verosimilitud (LogL), el valor del criterio de información de Akaike corregido para tamaños de muestra pequeños (AICc), el cambio en el valor de AICc (Δ AICc) y el peso del AICc (wAICc)

Modelo candidato	LogL	AICc	Δ AICc	wAICc
Log(Concentración de amonio)				
Log(Concentración de amonio) ~ Especie	-107.020	222.7	0.00	0.533
Log(Concentración de amonio) ~ 1	-108.733	223.9	1.16	0.299
Log(Concentración de amonio) ~ Tiempo de exposición a radiación UV + Especie	-107.476	226.0	3.26	0.105
Log(Concentración de amonio) ~ Tiempo de exposición a radiación UV	-109.150	227.0	4.26	0.063

Nota: El *Pool* al que corresponde cada muestra fue utilizado como el efecto aleatorio en todos los modelos.

Dentro de los modelos propuestos, tanto el que presenta a la especie evaluada como variable predictora, como el modelo nulo son igual de parsimoniosos. El modelo que contiene la variable predictora solo posee el 53.3% de los datos que pueden ser explicados por los modelos propuestos.

Cuadro 6. Tamaño del efecto (β), error estándar (SE), límite inferior (LIC) y superior (LSC) del intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los *pools* de mutantes generados.

Variable	β	SE	LIC	LSC
Log(Concentración de amonio)				
Intercepto	1.8883	25.365	1.1668692	2.609715
Especie	45.644	15.910	-0.1193031	1.921189

Nota: La especie no muestra un efecto claro. Para dicho factor, el nivel de referencia es *K. oxytoca*.

Se obtuvo que la especie bacteriana no presenta un efecto claro sobre la cantidad de amonio que los *pools* de mutantes producen.

Para el análisis del efecto del tiempo sobre la cantidad de amonio producida, se evaluaron de forma separada las muestras correspondientes a cada especie analizada (n=33) y sus *pools* correspondientes (11). Para el caso de *L. sphaericus*, el NMDS no parece indicar una diferencia entre tiempos de exposición. Esto es confirmado mediante el modelo lineal generalizado, en el que el tiempo de exposición no presenta un efecto claro, como se observa en el intervalo de confianza mostrado en el cuadro 8.

Caso contrario se observó en el caso de *K. oxytoca*, en la que el NMDS presenta a las muestras expuestas a radiación en un grupo separado respecto a las muestras no expuestas. Esto se confirma con el modelo efectuado, en el cual se determinó que la exposición a radiación UV tiene un efecto claro, negativo, respecto a la producción de amonio para esta especie, como se observa en el cuadro 10.

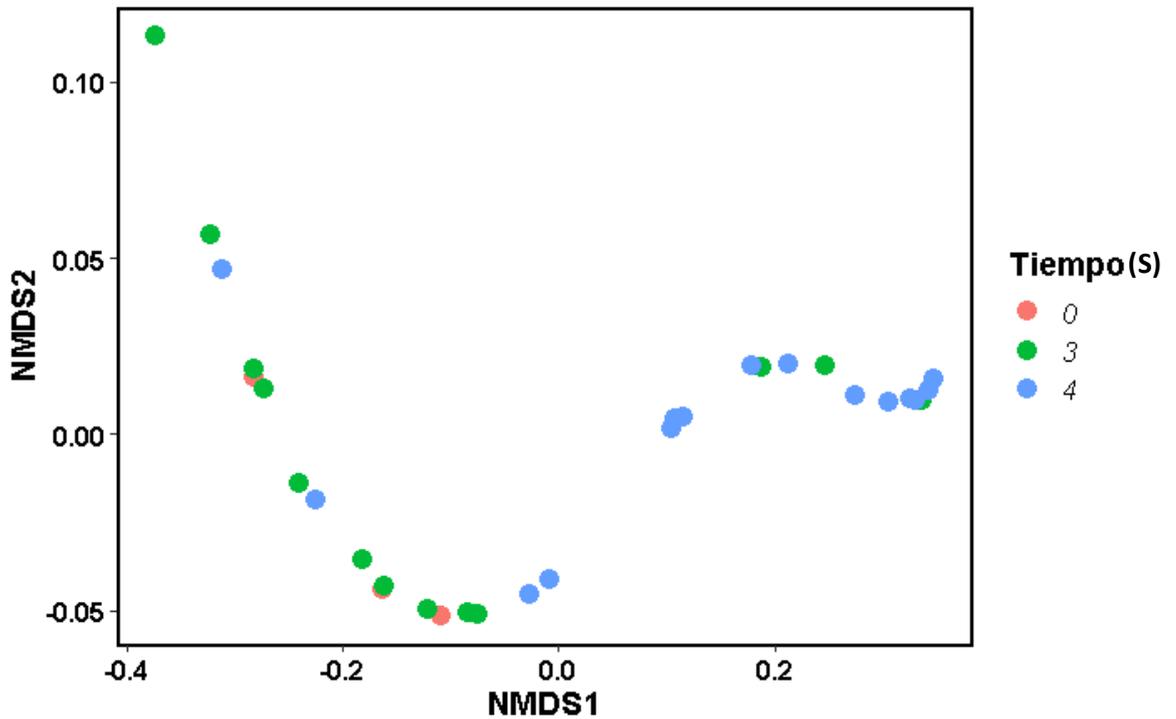


Figura 11. NMDS para evaluar las diferencias en la concentración de amonio producido tras 48 horas por parte de los *pools* de *L. sphaericus*, en los tiempos evaluados.

Al analizar de forma separada los datos obtenidos para *L. sphaericus*, aun no se aprecia la formación de un grupo distinguible que muestre, a nivel cualitativo, un efecto del tiempo de exposición a radiación UV sobre la producción de amonio.

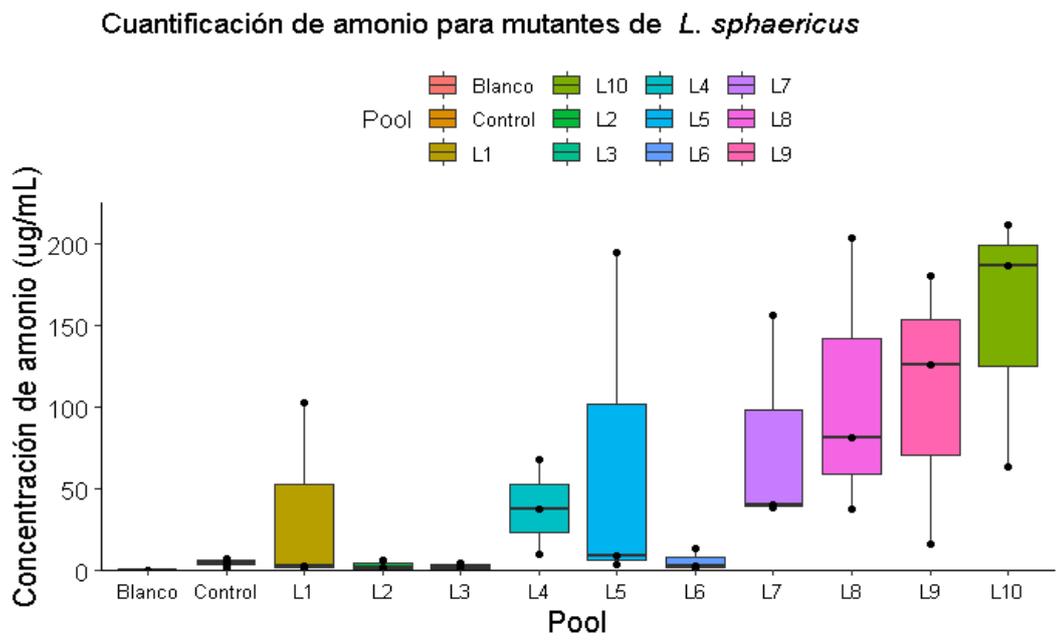


Figura 12. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de *L. sphaericus* generados tras su exposición a radiación UV. Los pools 1-5 fueron irradiados por 3 segundos y las muestras 6-10 por 4 segundos, bajo las condiciones previamente descritas.

Al analizar de forma independiente la cuantificación de amonio para *L. sphaericus*, se obtuvo que 7 de 10 pools analizados parecen mostrar una capacidad productora de amonio superior, en comparación al control utilizado.

Cuantificación de amonio para mutantes de *L. sphaericus*

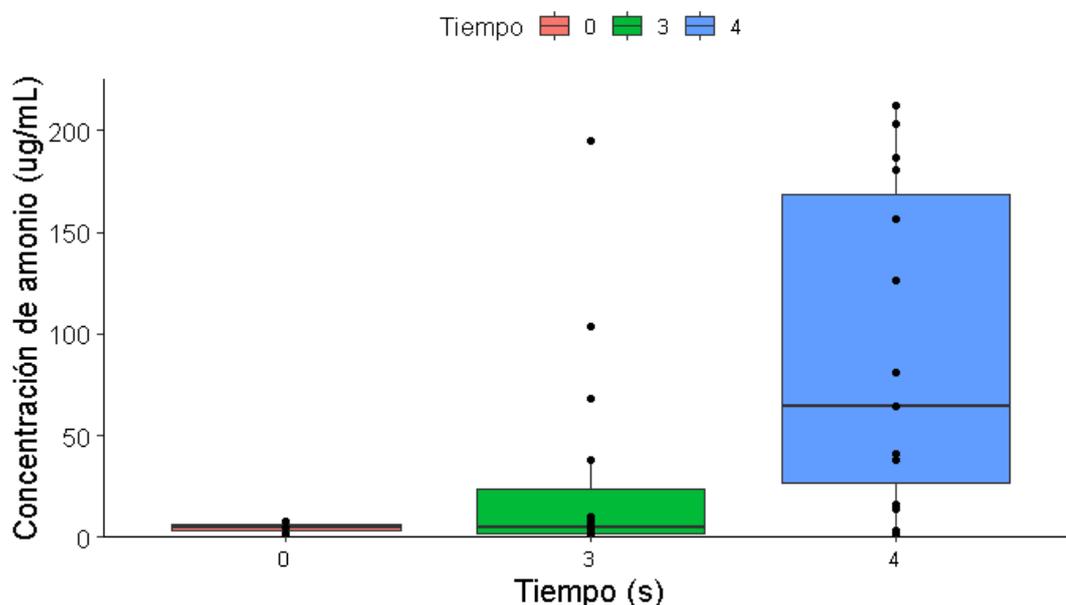


Figura 13. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de *L. sphaericus*, acorde al tiempo de exposición a radiación UV.

En cuanto al tiempo de exposición a radiación bajo las condiciones descritas, a nivel cualitativo, no se aprecia una diferencia marcada entre los distintos tiempos utilizados. Los tiempos 3 y 4s muestran una variabilidad más grande en comparación al tiempo de exposición 0s

Cuadro 7. Resumen de la selección del modelo lineal mixto generalizado propuesto para predecir la cantidad de amonio fijado por los pools mutantes generados de *L. sphaericus*. Se incluye, para cada modelo candidato, el logaritmo de la verosimilitud (LogL), el valor del criterio de información de Akaike corregido para tamaños de muestra pequeños (AICc), el cambio en el valor de AICc (Δ AICc) y el peso del AICc (wAICc)

Modelo candidato	LogL	AICc	Δ AICc	wAICc
Log(Concentración de amonio)				
Log(Concentración de amonio) ~ Tiempo de exposición a radiación UV	-60.228	129.9	0.00	0.539
Log(Concentración de amonio) ~ 1	-61.683	130.2	0.31	0.461

Nota: El *Pool* al que corresponde cada muestra fue utilizado como el efecto aleatorio en todos los modelos.

En comparación a un modelo nulo, el modelo que incluye al tiempo de exposición a radiación UV resulta igual de parsimonioso, en adición, solo es capaz de predecir un 53.9% de los datos que los modelos generados pueden predecir.

Cuadro 8. Tamaño del efecto (β), error estándar (SE), límite inferior (LIC) y superior (LSC) del intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los *pools* de mutantes generados para *L. sphaericus*.

Variable	β	SE	LIC	LSC
Concentración de amonio				
Intercepto	0.6251	1.2746	-1.84706120	3.097219
Tiempo de exposición a radiación UV	0.6802	0.3781	-0.05319194	1.413519

Nota: La variable explicativa no presenta un efecto claro.

La variable incluida en el modelo propuesto no presenta un efecto claro sobre la cantidad de amonio producida por parte de los *pools* de mutantes de *L. sphaericus* generados.

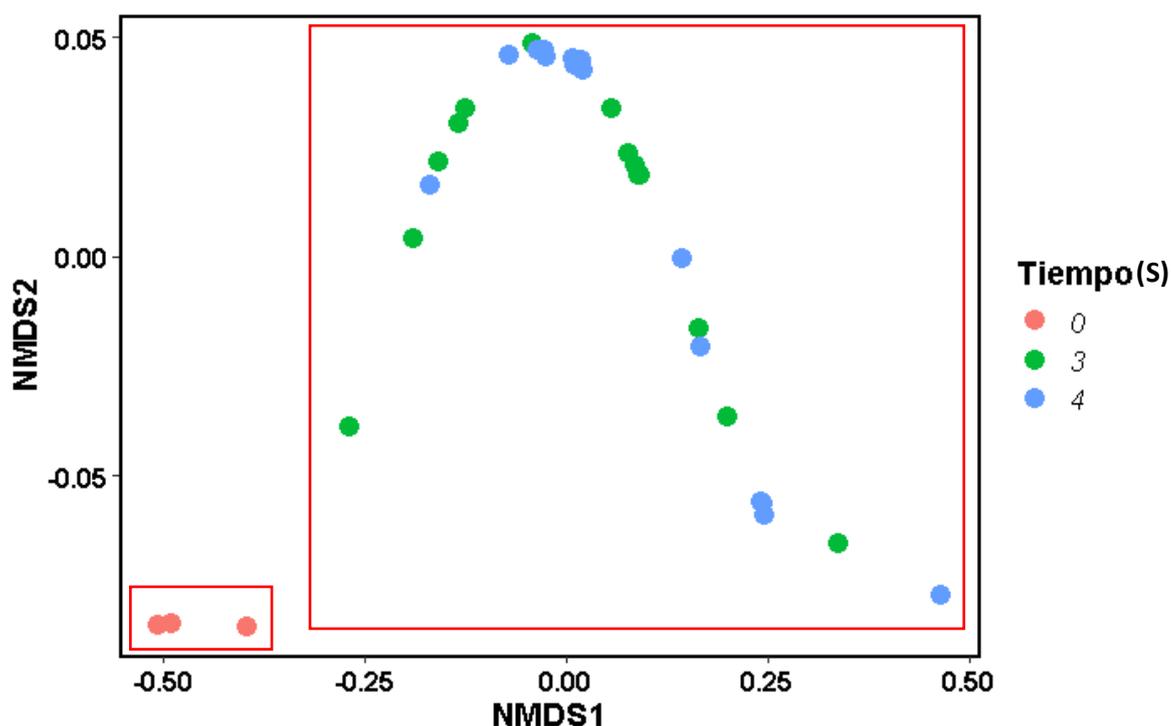


Figura 14. NMDS para evaluar las diferencias en la concentración de amonio producido tras 48 horas por parte de los *pools* de *K. oxytoca* en los tiempos evaluados.

Tras analizar de forma individual los resultados de los *pools* de *K. oxytoca*, se aprecia a nivel cualitativo que las muestras que fueron expuestas 0s a la radiación UV se agrupan en un grupo distinto a aquellas que fueron expuestas 3 y 4s.

Cuantificación de amonio para mutantes de *K. oxytoca*

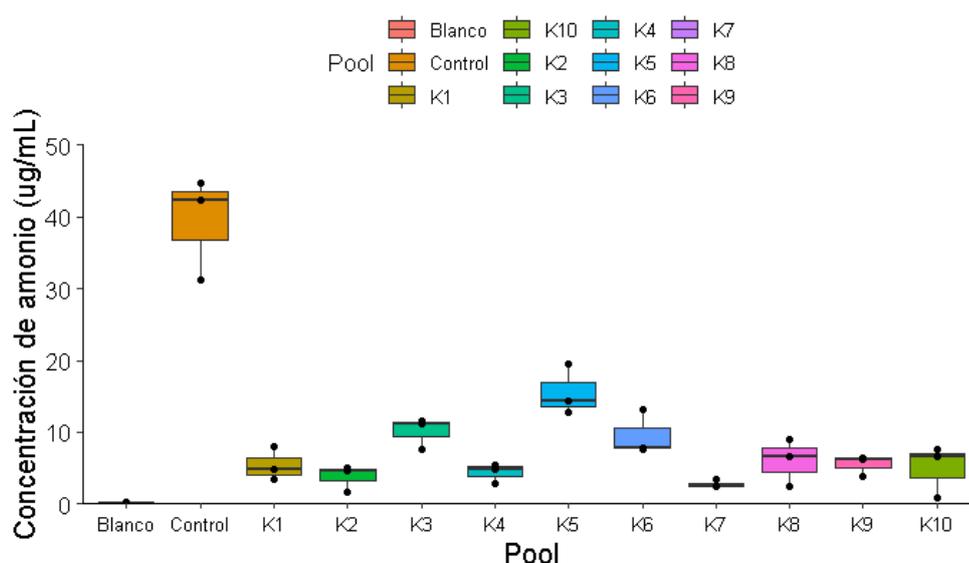


Figura 15. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de *K. oxytoca* generados tras su exposición a radiación UV. Los *pools* 1-5 fueron irradiados por 3 segundos y las muestras 6-10 por 4 segundos, bajo las condiciones previamente descritas.

Concordando con lo obtenido en el NMDS, se aprecia que hay una diferencia clara en la producción de amonio entre las bacterias que fueron expuestas a la radiación UV y las que no.

Cuantificación de amonio para mutantes de *K. oxytoca*

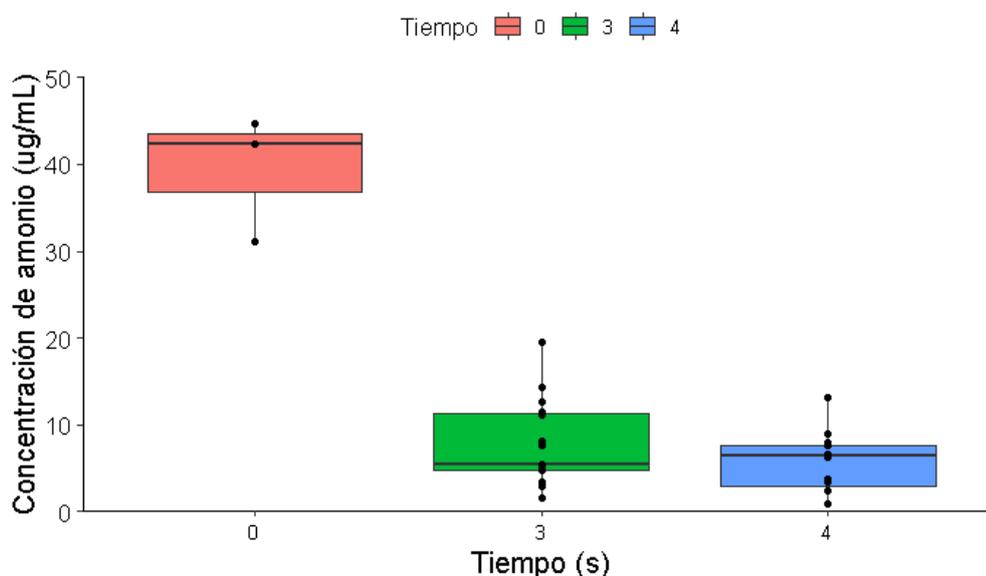


Figura 16. Visualización de la concentración de amonio producida por los mutantes de *K. oxytoca*, acorde al tiempo de exposición a radiación UV.

Al agrupar los *pools* de *K. oxytoca* acorde al tiempo de exposición, se aprecia de forma mas clara a nivel cualitativo el efecto de la exposición a radiación UV sobre la producción de amonio de dicha especie.

Cuadro 9. Resumen de la selección del modelo lineal mixto generalizado propuesto para predecir la cantidad de amonio fijado por los pools mutantes generados de *K. oxytoca*. Se incluye, para cada modelo candidato, el logaritmo de la verosimilitud (LogL), el valor del criterio de información de Akaike corregido para tamaños de muestra pequeños (AICc), el cambio en el valor de AICc ($\Delta AICc$) y el peso del AICc ($wAICc$)

Modelo candidato	LogL	AICc	$\Delta AICc$	$wAICc$
Concentración de amonio				
Concentración de amonio ~ Tiempo de exposición a radiación UV	-93.096	195.6	0.00	1
Concentración de amonio ~ 1	-102.131	211.1	15.47	0

Nota: El *Pool* al que corresponde cada muestra fue utilizado como el efecto aleatorio en todos los modelos.

Frente a un modelo nulo, el modelo que incluye el tiempo de exposición a radiación UV para explicar la cantidad de amonio producido por los mutantes de *K. oxytoca* es el más parsimonioso y es capaz de explicar un 100% de los datos que pueden ser predichos por el conjunto de modelos propuestos.

Cuadro 10. Tamaño del efecto (β), error estándar (SE), límite inferior (LIC) y superior (LSC) del intervalo de 95% de confianza para las variables incluidas en el modelo más parsimonioso para describir la cantidad de amonio producida por los *pools* de mutantes generados para *K. oxytoca*.

Variable	β	SE	LIC	LSC
Concentración de amonio				
Intercepto	35.159	4.609	4.3923258	5.2619517
Tiempo de exposición a radiación UV	-7.983	1.367	-10.634556	-5.330919

Nota: La variable explicativa presenta un efecto claro.

Para la predicción de la cantidad de amonio producida por los pools de mutantes de *K. oxytoca* generados, el tiempo de exposición a radiación UV presenta un efecto claro.

IX. Análisis de resultados

El objetivo del proyecto de investigación fue cumplido, pues fue posible desarrollar un protocolo que permita inducir mutaciones en bacterias de interés, así como evaluar el cambio en un rasgo fenotípico tras dicho proceso, en este caso, la fijación de nitrógeno. Para el presente, la inducción de mutaciones fue evaluada de forma indirecta mediante las curvas de supervivencia, pues la forma en la que la radiación UV afecta a la supervivencia bacteriana es mediante la inducción de mutaciones, específicamente, formación de dímeros de pirimidina. En cuanto a los efectos de este proceso sobre la fijación de nitrógeno, esto se evaluó mediante la producción de amonio en un medio libre de nitrógeno.

Para la supervivencia de las bacterias analizadas, se obtuvo que la radiación UV tuvo un efecto claro negativo tanto para el caso de bacterias Gram negativas como Gram positivas. A primera instancia, esto sugiere que el efecto de la radiación UV no se ve influenciado por la composición de la pared celular de la especie analizada. Pullerits y colaboradores (2020), indican que el contenido de guanina y citocina de cada taxa se correlaciona con su sensibilidad a la radiación UV. Por otro lado, McKinney y Pruden (2012) evaluaron el efecto de la radiación UV en 4 bacterias, de las cuales las 2 Gram positivas mostraron una menor sensibilidad en comparación a las 2 Gram negativas. En conjunto, esto sugiere que la composición de la membrana no es el único factor determinante para la supervivencia de la bacteria tras ser expuesta a radiación UV pero si contribuye a dicho fenómeno.

En el caso de las 2 especies Gram negativas evaluadas, los resultados del modelo generado indican que hay un efecto claro que hace que *P. aeruginosa* sea más susceptible que *K. oxytoca* a la radiación UV a 425nm (Cuadro 2). Lo obtenido se relaciona con lo descrito por Rezaie y colaboradores (2020), quienes observaron que para *P. aeruginosa*, la exposición a radiación UV mostró un mayor efecto sobre su crecimiento, en comparación a otra especie del género *Klebsiella*, *K. pneumoniae*, en 3 tiempos de exposición distintos. A nivel visual, no se observa una región de la curva en particular en la que dicho efecto se manifieste de forma clara (Figura 7), por lo que se infiere que el efecto de la radiación UV es constante a lo largo del tiempo de exposición.

En el caso de *L. sphaericus*, como se observa en la Figura 3, la probabilidad de supervivencia aumenta mientras menos se expone la muestra a radiación UV, lo que concuerda con lo mencionado previamente. A pesar de esto, hubo una muestra que no presentó crecimiento aun en ausencia de exposición a la radiación. Se plantea que esto puede estar relacionado al hecho de que, en un inicio, se estaba teniendo dificultad para obtener colonias aisladas tras esparcir el inóculo en la caja Petri. A diferencia de las bacterias Gram negativas evaluadas, esta no se disuelve en su totalidad al inocularla en el medio líquido, en su lugar, quedaba un precipitado, que se atribuye a las esporas formadas por esta especie, el cual era descartado previo a inocular el agar. En pruebas posteriores, se conservó este precipitado, tras lo que fue posible obtener colonias

aisladas. A pesar de que el efecto de la radiación UV sobre esta especie no pudo ser comparado de forma directa con las Gram negativas, se espera que el efecto de esta fuese menor, debido a su capacidad de formar estructuras de supervivencia (Rojas y Dussán, 2017). A pesar de esto, la suficiente dosificación de radiación UV puede hacer que *L. sphaericus* pierda la viabilidad de sus esporas (Çökmüs, *et al.*, 2000)

En cuanto a la cuantificación de amonio producido, tanto *K. oxytoca* como *L. sphaericus* han sido reportadas como fijadoras de nitrógeno (Temme, *et al.*, 2012) (Martínez y Dussan, 2017). En este caso, todos los *pools* de mutantes de *K. oxytoca* mostraron una actividad fijadora de nitrógeno reducida en comparación a la muestra control, como se aprecia en la Figura 15. En el caso de *L. sphaericus*, 7 *pools* presentaron mutantes con una capacidad de producción de amonio aparentemente mejorada comparada al control, como se aprecia en la Figura 12. El porqué de este efecto debe determinarse mediante la secuenciación de los genes *nif*. Debido a la naturaleza aleatoria del proceso y al bajo número de replicas, se plantea que aumentando el número de replicas, se obtendría un comportamiento similar para ambas especies. Para *L. sphaericus*, por ejemplo, el gen *nifQ* únicamente tiene 49 potenciales sitios para inducir dímeros de pirimidinas (Shabanamol, *et al.*, 2018). Para *K. oxytoca*, *nifQ* contiene al menos 54 potenciales sitios para que la radiación UV genere dichos productos secundarios (Arnold, *et al.*, 1988). Con esto en consideración, ambas especies pueden ser sometidas a un proceso de mutagénesis por dicha fuente de radiación.

Para la evaluación de los mutantes generados, se analizó en *pools* debido a que no se disponía de los recursos para analizar cada colonia obtenida de forma individual. Como se observa en la Figura 10, se obtuvo una mayor variabilidad dentro de los *pools* para el caso de *L. sphaericus*. Esto sugiere que la mutagénesis aleatoria genera mutaciones cuyo impacto es más variable en *L. sphaericus* que en *K. oxytoca*. Se plantea que esta variabilidad no viene directamente de las mutaciones inducidas, sino de la capacidad de cada especie para repararlas. Lamprecht y colaboradores (2020) encontraron 5 genes en *Escherichia coli* asociados específicamente a la protección frente a radiación UV, adicionales a los mecanismos previamente conocidos de reparación a las lesiones inducidas por esta. Se plantea que los *pools* de *K. oxytoca* tiene una maquinaria celular que repara y previene las mutaciones inducidas por radiación UV con mayor eficacia, en comparación a *L. sphaericus*.

Debe tomarse en cuenta que, al haber analizado los mutantes en forma de *pools*, no es posible determinar exactamente que colonia mutante está contribuyendo a la fijación de nitrógeno mejorado. Se debe tomar en cuenta que hay casos en los que los genes *nif* están regulados de forma negativa por el nitrógeno disponible en el medio, de forma que al haber nitrógeno en exceso, el proceso se reprime (Wang, *et al.*, 2018). Al incluir el *pool* varios mutantes, se plantea pudo haber interferencia en la capacidad fijadora de nitrógeno de cada uno de ellos por el nitrógeno fijado por los mutantes con los que compartía *pool*. Es posible que hayan mutantes en las que el mecanismo regulatorio frente a una fuente exógena de nitrógeno haya sido inhabilitado a causa de la radiación, por lo que estos mutantes fueron capaces de seguir fijando nitrógeno.

El que las muestras evaluadas presenten una capacidad fijadora de nitrógeno distintas al control utilizado para cada especie indica que las mutaciones generadas no

fueron reparadas al momento de llevar a cabo la cuantificación. Esto se atribuye al hecho de que el medio Burk utilizado para evaluar la capacidad productora de amonio fue suministrado con cafeína al 0.6%. Majumdar y Chandra (1985), propusieron que la presencia de cafeína en el medio inhibe la vía de reparación de ADN que se activa inmediatamente tras la irradiación UV. Whitney y Weir (2015), proponen que la presencia de cafeína en el medio afecta la respuesta SOS de la bacteria, mediante la proteína UmuC, afectando la supervivencia celular. Otro factor para tomar en cuenta es que las muestras se protegieron de la luz directa tras la irradiación. Esto evita que la fotoliasa, enzima encargada de corregir los dímeros de pirimidina, se active. Esto hace que las mutaciones generadas persistan (Vechtomova, *et al.*, 2021).

Se descartó la evaluación de la actividad fijadora de nitrógeno de *P. aeruginosa* ya que se desconocía la procedencia de la cepa utilizada para evaluar las condiciones de supervivencia. Esta especie es potencialmente patógena y, dado que es deseable que las bacterias con fijación de nitrógeno mejorada sean aplicadas en cultivos, esta es una característica no deseada. A pesar de esto, aun se considera de interés evaluar una cepa no patogénica de esta especie, pues, además del potencial fijador de nitrógeno, se ha descrito su capacidad desnitrificante, lo que implica que puede llegar a mitigar el efecto ambiental de los gases de efecto invernadero nitrificados que se originan a partir de la suministración artificial de nitrógeno (Arat, *et al.*, 2015).

Dentro de las limitaciones del estudio, en primer lugar, se tiene que no se cuenta con la información de dosimetría para la radiación UV a 425nm que incidió sobre la muestra. Debido a esto, la información del efecto del tiempo de exposición a radiación UV presentada se limita a una exposición bajo las condiciones del prototipo de cámara UVGi P001 marca Serproma. Con esto en consideración, se recomienda determinar la dosis de radiación incidente en el punto de exposición, de forma que pueda replicarse la metodología con otro tipo de equipo.

En segundo lugar, se tiene la limitante de que no fue posible evaluar el crecimiento de colonias aisladas de bacterias Gram positivas, por lo que no es posible comparar el tamaño del efecto obtenido para las bacterias Gram negativas con el obtenido para *L. sphaericus*. Se recomienda evaluar el crecimiento de otras bacterias Gram positivas y Gram negativas con la metodología descrita para la evaluación de los tiempos de supervivencia, de manera que el tamaño del efecto sea comparable entre bacterias con distinta composición en la pared celular, contenido CG, cambio en morfología, producción de estructuras de supervivencia, entre otras variables que pueden impactar dicho fenómeno.

X. Conclusiones

1. Fue posible elaborar un protocolo que permita someter a mutagénesis aleatoria por radiación UV a 425nm a *K. oxytoca* y *L. sphaericus* y evaluar su efecto en la capacidad fijadora de nitrógeno de estas.
2. Siete de los 10 pools mutantes de *L. sphaericus* evaluados mostraron una capacidad fijadora de nitrógeno aparentemente mejorada.
3. Ninguno de los pools mutantes de *K. oxytoca* evaluados mostraron una capacidad fijadora de nitrógeno aparentemente mejorada.
4. Tanto el tiempo de exposición a radiación UV como la especie evaluada son factores con un efecto claro sobre la supervivencia de bacterias Gram negativas.
5. El tiempo de exposición a radiación UV presenta un efecto claro negativo sobre la supervivencia de *L. sphaericus*.
6. La especie evaluada no presenta un efecto claro sobre la producción de amonio por parte de los mutantes generados.
7. El tiempo de exposición a radiación UV presenta un efecto claro negativo sobre la capacidad de *K. oxytoca* para producir amonio.

XI. Recomendaciones

1. Evaluar el efecto de la exposición de los mutantes a luz directa tras la irradiación sobre la producción de amonio.
2. Evaluar el efecto de la ausencia de cafeína en el medio selectivo sobre la producción de amonio por parte de los mutantes.
3. Incluir en la curva de supervivencia especies Gram negativas, para poder comparar el tamaño del efecto de la naturaleza Gram de la bacteria sobre su supervivencia.
4. Analizar la capacidad fijadora de nitrógeno de forma individual para las colonias contenidas en los pools que presentaron una capacidad fijadora de nitrógeno mejorada.
5. Secuenciar los genes *nif* de los mutantes contenidos en los pools que presentaron una capacidad fijadora de nitrógeno mejorada, para diseñar un ensayo de mutagénesis dirigida que permita evaluar el efecto de estas mutaciones.
6. Realizar una curva de crecimiento para los mutantes contenidos en los pools que presentaron una capacidad fijadora de nitrógeno mejorada, de forma que pueda obtenerse una idea del fitness de estas en un medio nutritivo.

XII. Referencias

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Anas, M., Liao, F., Verma, K. K., Sarwar, M. A., Mahmood, A., Chen, Z.-L., ... Li, Y.-R. (2020). Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. *Biological Research*, 53(1). doi:10.1186/s40659-020-00312-4
- Arat, S., Bullerjahn, G. S., & Laubenbacher, R. (2015). A Network Biology Approach to Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 10(2), e0118235. doi:10.1371/journal.pone.011823
- Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. B., & Pühler, A. (1988). Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*, 203(3), 715–738. doi:10.1016/0022-2836(88)90205-7
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01473
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1-2), 413–431. doi:10.1007/s11104-014-2186-6
- Barton, K. (2020). MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

- Bassi, D., Menossi, M., & Mattiello, L. (2018). Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-20653-1
- Bates H, Randall SK, Rayssiguier C, Bridges BA, Goodman MF, Radman M. Spontaneous and UV-induced mutations in Escherichia coli K-12 strains with altered or absent DNA polymerase I. *J Bacteriol.* 1989 May;171(5):2480-4. doi: 10.1128/jb.171.5.2480-2484.1989. PMID: 2651403; PMCID: PMC209924.
- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., ... Gojon, A. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transceptor NRT1.1. *Nature Plants*, 1(3), 15015. doi:10.1038/nplants.2015.15
- Brooks, M., Kristensen, K., van Benthem, K., Magnusson, A., Berg, C., Nielsen, A., Skaug, H., Maechler, M., Bolker, B. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalize Linear Mixed Modeling. *The R Journal*, 9(2), 378-400.
- Chai, R., Ye, X., Ma, C., Wang, Q., Tu, R., Zhang, L., & Gao, H. (2019). Greenhouse gas emissions from synthetic nitrogen manufacture and fertilization for main upland crops in China. *Carbon Balance and Management*, 14(1). doi:10.1186/s13021-019-0133-9
- Chandrasekhar, D., Van Houten, B. (2000). In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and nucleotide level in Escherichia coli. *Mutation research*, 450(1-2), 19–40. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00014-2)
- Chung, W.-H. (2021). Pleiotropic Effects of Caffeine Leading to Chromosome Instability and Cytotoxicity in Eukaryotic Microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 171–180. <https://doi.org/10.4014/jmb.2011.11042>
- Çökmüs, C., HakkiSayar, A., Saçilik, S. C., Osmanağaoğlu, Ö., Berber, İ. (2000). Effects of UV-light on Bacillus sphaericus and its protection by chemicals. *Journal of Basic Microbiology*, 40(4), 215–221. doi:10.1002/1521-4028(200008)40:4<215::aid-jobm215>3.0.co;2-h
- Coohill, T., Sagripanti, J. (2008). Overview of the Inactivation by 254 nm Ultraviolet Radiation of Bacteria with Particular Relevance to Biodefense. *Photochemistry and Photobiology*. 84, 1084–1090.
- Drummond1, M. H., Wootton, J. C. (1987). Sequence of nifL from Klebsiella pneumoniae: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, 1(3), 37–44. doi:10.1111/j.1365-2958.1987.tb00524.x

- España Exportación e Inversiones [ICEX]. (2021). *Sector agrícola en Guatemala*. España: Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Guatemala.
- Fan, X., Naz, M., Fan, X., Xuan, W., Miller, A. J., & Xu, G. (2017). Plant nitrate transporters: from gene function to application. *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2463–2475. doi:10.1093/jxb/erx011
- Fernando, K. M., Ehoche, O. G., Atkinson, J. A., & Sparkes, D. L. (2021). Root System Architecture and nitrogen uptake efficiency of wheat species. *Journal of Agricultural Sciences – Sri Lanka*, 16(1), 37. <https://doi.org/10.4038/jas.v16i1.9182>
- Gao, J., Luo, Y., Wei, Y., Huang, Y., Zhang, H., He, W., ... An, L. (2019). Screening of plant growth promoting bacteria (PGPB) from rhizosphere and bulk soil of *Caragana microphylla* in different habitats and their effects on the growth of *Arabidopsis* seedlings. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 921–930. doi:10.1080/13102818.2019.16298
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., Catara, V., Ortiz, R., & Vetukuri, R. R. (2022). Plant growth-promoting activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and its ability to act as a biocontrol agent against potato, tomato and taro pathogens. *Biology*, 11(1), 140. <https://doi.org/10.3390/biology11010140>
- Gillette, K., Malone, R. W., Kaspar, T. C., Ma, L., Parkin, T. B., Jaynes, D. B., ... Kersebaum, K. C. (2018). N loss to drain flow and N₂O emissions from a corn-soybean rotation with winter rye. *Science of The Total Environment*, 618, 982–997. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09
- Glass, A. (2009). Nitrate uptake by plant roots. *Botany*, 87(7), 659–667. doi:10.1139/b09-014
- Glick B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Govantes, F., Andújar, E., & Santero, E. (1998). Mechanism of translational coupling in the *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *The EMBO journal*, 17(8), 2368–2377. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2368>
- Gruber, N., Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293–296. doi:10.1038/nature06592
- Hartig, F. (2022). DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. R package version 0.4.5. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMa>

- Howard, D., Gwathmey, C., Essington, M. E., Roberts, R. K., Mullen, M. (2001). Nitrogen fertilization of No-till cotton on loess-derived soils. *Agronomy Journal*, 93(1), 157–163. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.931157x>
- Hodge, A., Robinson, D., & Fitter, A. (2000). Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science*, 5(7), 304–308. doi:10.1016/s1360-1385(00)01656-3
- Imperial, J., Ugalde, R. A., Shah, V. K., & Brill, W. J. (1984). Role of the nifQ gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 158(1), 187–194. <https://doi.org/10.1128/jb.158.1.187-194.1984>
- Inanc, A. (2011). Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Akademik Gida*, 9.
- Jackman, S. (2020). pscl: Classes and Methods for R Developed in the Political Science Computational Laboratory. United States Studies Centre, University of Sydney. Sydney, New South Wales, Australia. R package version 1.5.5. URL <https://github.com/atahk/pscl/>
- Jeong, H., Park, J., Kim, H. (2013). Determination of NH₄⁺ in Environmental Water with Interfering Substances Using the Modified Nessler Method. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–9. doi:10.1155/2013/359217
- Joshi, S. M., Inamdar, S. A., Jadhav, J. P., Govindwar, S. P. (2013). Random UV mutagenesis approach for enhanced biodegradation of sulfonated azo dye, Green HE4B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(5), 1467–1481. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0062-5>
- Kanehisa Laboratories. (2021). *Nitrogen metabolism - Pseudomonas aeruginosa PA7* [Mapa metabólico]. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?pap00910
- Kassambara, A. (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P., Djordjevic, N., Giannoglou, M., Chanioti, S., Kasimatis, C.-N., Kakabouki, I., Leonidakis, D., Danalatos, N., Katsaros, G., & Efthimiadou, A. (2022). Assessment of plant growth promoting bacteria strains on growth, yield and quality of Sweet Corn. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16044-2>
- Kirkby, E., Le Bot, J., Adamowicz, S., Römheld, V. Nitrogen in physiology. (2009)

- An agronomic perspective and implications for the use of different nitrogen forms. *IFS Conference, International Fertiliser Society (IFS)*. GBR. Cambridge, United Kingdom. 46 p. ffhal02757766f
- Korner-Nievergelt, F., Roth, T., von Felten, S., Guelat, J., Almasi, B., Korner-Nievergelt, P. (2015). *_Bayesian Data Analysis in Ecology using Linear Models with R, BUGS and Stan_*. Elsevier.
- Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115–122. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.010
- Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.-S., ... Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 789–798. doi:10.1093/jxb/eru001
- Kucho, K. I., Tamari, D., Matsuyama, S., Nabekura, T., Tisa, L. (2017). Nitrogen Fixation Mutants of the Actinobacterium Frankia Casuarinae Cc13. *Microbes and environments*, 32(4), 344–351. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17099>
- Krishna, S., Maslov, S., & Sneppen, K. (2007). UV-Induced Mutagenesis in Escherichia coli SOS Response: A Quantitative Model. *PLoS Computational Biology*, 3(3), e41. doi:10.1371/journal.pcbi.003004
- Kumar, A., Sandhu, N., Kumar, P., Pruthi, G., Singh, J., Kaur, S., & Chhuneja, P. (2022). Genome-wide identification and in silico analysis of NPF, NRT2, CLC and SLAC1/slah nitrate transporters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15202-w>
- Lamprecht-Grandío, M., Cortesão, M., Mirete, S., de la Cámara, M. B., de Figueras, C. G., Pérez-Pantoja, D., ... González-Pastor, J. E. (2020). Novel Genes Involved in Resistance to Both Ultraviolet Radiation and Perchlorate From the Metagenomes of Hypersaline Environments. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00453
- Latifah, O., Ahmed, O., Majid, N. (2011). Ammonia loss, soil exchangeable ammonium and available nitrate contents from mixing urea with zeolite and peat soil water under non-waterlogged condition. *International Journal of the Physical Sciences*. 6(12), 2916-2920. DOI: 10.5897/AJBM11.061
- Li, J., McConkey, B. J., Cheng, Z., Guo, S., & Glick, B. R. (2013). Identification of plant growth-promoting bacteria-responsive proteins in cucumber roots under hypoxic stress using a proteomic approach. *Journal of proteomics*, 84, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.011>

- Li, Y., Ren, B., Ding, L., Shen, Q., Peng, S., Guo, S. (2013). Does Chloroplast Size Influence Photosynthetic Nitrogen Use Efficiency? *PLoS ONE*, 8(4), e62036. doi:10.1371/journal.pone.006203
- Lie, T., Kuo, Y., Leite, M., Costa, K., Harwood, C., Leigh, J. (2022). A Genetic Study of Nif-Associated Genes in a Hyperthermophilic Methanogen. *Microbiology Spectrum*. 10 (1). DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02093-21>
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. doi:10.1111/1751-7915.13517
- Long, J. (2020). *_jtools: Analysis and Presentation of Social Scientific Data_*. R package version 2.1.0, <URL:<https://cran.r-project.org/package=jtools>>.
- Lüdecke et al., (2021). performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3139. <https://doi.org/10.21105/joss.03139>
- Mahal, N. K., Osterholz, W. R., Miguez, F. E., Poffenbarger, H. J., Sawyer, J. E., Olk, D. C., ... Castellano, M. J. (2019). Nitrogen Fertilizer Suppresses Mineralization of Soil Organic Matter in Maize Agroecosystems. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. doi:10.3389/fevo.2019.00059
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Majumdar, S., Chandra, A. (1985). UV-repair and Mutagenesis in *Azotobacter vinelandii*. *Zbl. Mikrobiol.* 140, 255- 258.
- Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., & Dixon, R. (2004). The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 601–610. doi:10.1128/jb.186.3.601-610.2004
- Martínez-Dalmau, J., Berbel, J., & Ordóñez-Fernández, R. (2021). Nitrogen Fertilization. A Review of the Risks Associated with the Inefficiency of Its Use and Policy Responses. *Sustainability*, 13(10), 5625. doi:10.3390/su13105625
- Martínez, S. A., & Dussán, J. (2017). *Lysinibacillus sphaericus* plant growth promoter bacteria and lead phytoremediation enhancer with *Canavalia ensiformis* . *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(1), 276–282.
- Matthews, S., & Suhaimi, M. (2010). Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *J Trop Agric Food Sci*, 38, 211–219.

- McKinney C., Pruden A. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. (2012). *Environ Sci Technol.* 18, 46(24):13393-400. doi: 10.1021/es303652q.
- Miller, R. W., & Eady, R. R. (1988). Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *The Biochemical journal*, 256(2), 429–432. <https://doi.org/10.1042/bj2560429>
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación [MAGA]. (2022). Informe semanal de precios Período del 13 al 19 de Enero 2022. Guatemala: MAGA.
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación [MAGA]. (2012). *Acceso Informacion - Roya del café*. Guatemala: MAGA.
- Moolenaar, G. F., Moorman, C., Goosen, N. (2000). Role of the *Escherichia coli* nucleotide excision repair proteins in DNA replication. *Journal of bacteriology*, 182(20), 5706–5714. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5706-5714.2000>
- Muratore, C., Espen, L., & Prinsi, B. (2021). Nitrogen Uptake in Plants: The Plasma Membrane Root Transport Systems from a Physiological and Proteomic Perspective. *Plants*, 10(4), 681. doi:10.3390/plants10040681
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 24542, *Potassium mercuric iodide*. Recuperado el 28 de agosto de 2022 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Potassium-mercuric-iodide>
- Neuwirth, E. (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-2. <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>
- Oksanen, F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, McGlenn, D., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H. (2020). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (Recuperado en 2022). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#country/89>
- Pérez, O., Ovalle, W., Rodas, A., López, E., Hernandez, F. (2003). *Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Caña de Azúcar. Métodos para multiplicación e inoculación y comportamiento de variedades promisorias en campo*. Guatemala: Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar.
- Pérez, R., Gonzales, A., Mendoza, R., Cotrina, G. (2021). Dosimetría Mutagénica en Gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* L.) con Azida de Sodio. *Ciencia Latina*. 5(3), 2605-2621.

- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team. (2022). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-155, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.
- Pullerits, K., Ahlinder, J., Holmer, L., Salomonsson, E., Öhrman, C., Jacobsson, K., ... Rådström, P. (2020). Impact of UV irradiation at full scale on bacterial communities in drinking water. *Npj Clean Water*, 3(1). doi:10.1038/s41545-020-0057-7
- Rayo, M. (2021). Efecto de irradiación con rayos X como fuente de inducción de mutaciones en plantas *in vitro* de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* y *X. violaceum* L. Schott). Tesis Universidad Nacional Agraria. Managua: Universidad Nacional Agraria. 41 págs.
- Rezaie, A., Leite, G., Melmed, G. Y., Mathur, R., Villanueva-Millan, M. J., Parodi, G., Sin, J., Germano, J. F., Morales, W., Weitsman, S., Kim, S. Y., Park, J. H., Sakhaie, S., & Pimentel, M. (2020). Ultraviolet A light effectively reduces bacteria and viruses including coronavirus. *PloS one*, 15(7), e0236199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236199>
- Rilling, J. I., Acuña, J. J., Sadowsky, M. J., & Jorquera, M. A. (2018). Putative Nitrogen-Fixing Bacteria Associated With the Rhizosphere and Root Endosphere of Wheat Plants Grown in an Andisol From Southern Chile. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02710
- Rodas, R. (2021). *Fertilización al suelo en el cultivo de café*. Guatemala: Anacafé. <https://www.anacafe.org/uploads/file/b04fcfca54b5d804dde3462b59828/03-Fertilizaci%C3%B3n-al-suelo.pdf>
- Rojas-Pinzón, P. A., & Dussán, J. (2017). Efficacy of the vegetative cells of *Lysinibacillus sphaericus* for biological control of insecticide-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi:10.1186/s13071-017-2171-z
- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., ... Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen Fixation in Cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01794.
- Sarkar, D. (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, New York. ISBN 978-0-387-75968-5
- Schmidhuber, J. (2022). Informal Briefing of FAO Members on: Soaring fertilizer prices: Drivers and possible impacts [Diapositiva]. FAO. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/PermRep/docs/Notice_Board/Fertilizers/Informal_briefing_3_3_2022_presentation.pdf

- Schroder, J. L., Zhang, H., Girma, K., Raun, W. R., Penn, C. J., & Payton, M. E. (2011). Soil Acidification from Long-Term Use of Nitrogen Fertilizers on Winter Wheat. *Soil Science Society of America Journal*, 75(3), 957. doi:10.2136/sssaj2010.0187.
- Selby, C., Sancar, A. (1990). Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl. Acad Sci*, 87, 3522-3525.
- Shabanamol, S., Divya, K., George, T. K., Rishad, K. S., Sreekumar, T. S., & Jisha, M. S. (2018). Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 46–54. doi:10.1016/j.pmpp.2017.11.003
- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., & Smith, D. L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience . *In Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 5). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2021.667546>
- Shanavas, J. (2007). Effect of UV mutation on the Nitrogenase activity and pesticide tolerance of *Azotobacter* sp isolated from Rhizosphere soil. *Pollution Research*. 26(4):773-776.
- Shibai, A., Takahashi, Y., Ishizawa, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Ying, B.-W., & Tsuru, S. (2017). Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli* . *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-15008-1
- Souza, R. de, Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. doi:10.1590/s1415-475738420150053
- Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B. M., Mirza, M. (2018). Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PloS one*, 13(9), e0204408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204408>
- Temme, K., Zhao, D., & Voigt, C. A. (2012). Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18), 7085–7090. doi:10.1073/pnas.1120788109
- Trenberth, K. E., Guillemot, C. J. (1994). The total mass of the atmosphere. *Journal of Geophysical Research*, 99(D11), 23079. doi:10.1029/94jd02043
- Tsabar, M., Eapen, V. V., Mason, J. M., Memisoglu, G., Waterman, D. P., Long, M. J., ... Haber, J. E. (2015). Caffeine impairs resection during DNA break repair by reducing

- the levels of nucleases Sae2 and Dna2. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6889–6901. doi:10.1093/nar/gkv520
- van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., Jetten, M. S., & Lückner, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature16459>
- Vechtomova, Y. L., Telegina, T. A., Buglak, A. A., & Kritsky, M. S. (2021). UV Radiation in DNA Damage and Repair Involving DNA-Photolyases and Cryptochromes. *Biomedicines*, 9(11), 1564. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111564>
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Viswanathan, R., Rajitha, R., Sundar, A. R., Ramamoorthy, V. (2003). Isolation and identification of endophytic bacterial strains from sugarcane stalks and their in vitro antagonism against the red rot pathogen. *Sugar Tech*, 5(1-2), 25–29. doi:10.1007/bf02943760
- Wang, T., Zhao, X., Shi, H., Sun, L., Li, Y., Li, Q., Zhang, H., Chen, S., & Li, J. (2018). Positive and negative regulation of transferred nif genes mediated by indigenous GlnR in Gram-positive *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS genetics*, 14(9), e1007629. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007629>
- Wang, Y., Zhang, G., Huang, Y., Guo, M., Song, J., Zhang, T., Long, Y., Wang, B., & Liu, H. (2022). A potential biofertilizer—siderophilic bacteria isolated from the rhizosphere of *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870413>
- Watanabe, T., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A., Nakamura, T. (2011). A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. *Bioresource Technology*, 102(2), 1844–1848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.087>
- Whitney, A. K., & Weir, T. L. (2015). Interaction of caffeine with the SOS response pathway in *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 7(1). doi:10.1186/s13099-015-0069-x
- Wickham, H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40(1), 1-29. URL <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>.
- Wickham, H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Wickham, H., Bryan, J. (2019). readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>

- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K. (2022). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.10. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wickham, H., Seidel, D. (2022). scales: Scale Functions for Visualization. R package version 1.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=scales>
- Wongsanit, J., Teartisup, P., Kerdsueb, P., Tharnpoophasiam, P., & Worakhunpiset, S. (2015). Contamination of nitrate in groundwater and its potential human health: a case study of lower Mae Klong river basin, Thailand. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11504–11512. doi:10.1007/s11356-015-4347-4
- Xin, C., Qing-wei, Y., Jia-lin, S., Shuang, X., Fu-chun, X., Ya-jun, C. (2014). Research Progress on Nitrogen Use and Plant Growth. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 21(2), 68–74. doi:10.1016/s1006-8104(14)60036-2
- Yang, M., Zamba, G., Cavanaugh, J. (2018). ZIM: Zero-Inflated Models (ZIM) for Count Time Series with Excess Zeros. R package version 1.1.0 <https://CRAN.R-project.org/package=ZIM>
- Zeileis, A., Kleiber, C., Jackman, S. (2008). Regression Models for Count Data in R. *Journal of Statistical Software* 27(8). URL <http://www.jstatsoft.org/v27/i08/>.
- Zhang, J., He, P., Ding, W., Ullah, S., Abbas, T., Li, M., Ai, C., & Zhou, W. (2021). Identifying the critical nitrogen fertilizer rate for optimum yield and minimum nitrate leaching in a typical field radish cropping system in China. *Environmental Pollution*, 268, 115004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115004>.
- Zhang, M., Wang, L., & Zhong, D. (2017). Photolyase: Dynamics and Mechanisms of Repair of Sun-Induced DNA Damage. *Photochemistry and photobiology*, 93(1), 78–92. <https://doi.org/10.1111/php.12695>
- Zhao, Y., Shi, R., Bian, X., Zhou, C., Zhao, Y., Zhang, S., Wu, F., Waterhouse, G., Wu, L. Z., Tung, C. H., & Zhang, T. (2019). Ammonia Detection Methods in Photocatalytic and Electrocatalytic Experiments: How to Improve the Reliability of NH₃ Production Rates?. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)*, 6(8), 1802109. <https://doi.org/10.1002/advs.201802109>

XIII. Anexos

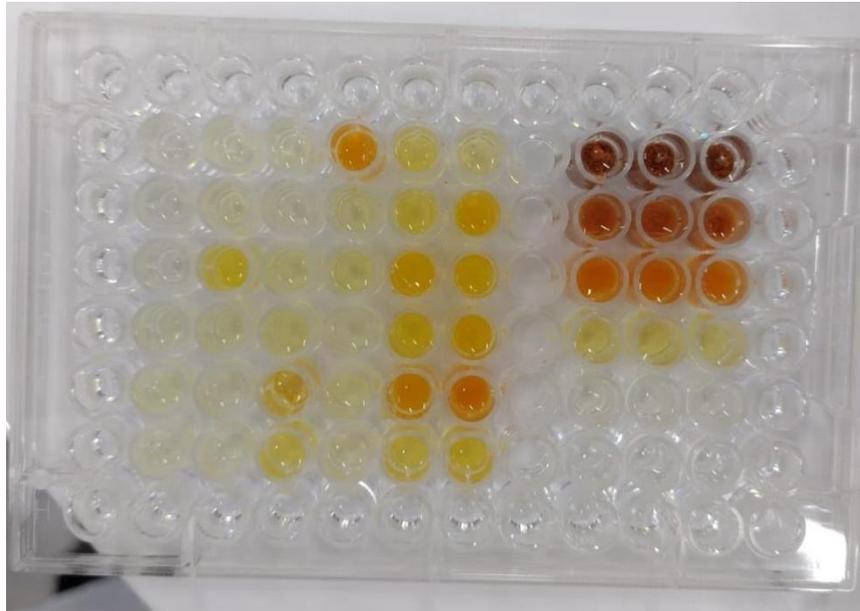


Figura 17. Prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los *pools* de mutantes de *L. sphaericus*.

Cuadro 11. Mapa de carga para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los *pools* de mutantes de *L. sphaericus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
B	U	B1	L11	L31	L51	L71	L91		E11	E12	E13	U
C	U	B1	L12	L32	L52	L72	L92		E21	E22	E23	U
D	U	B1	L13	L33	L53	L73	L93		E31	E32	E33	U
E	U	L01	L21	L41	L61	L81	L10 1		E41	E42	E43	U
F	U	L02	L22	L42	L62	L82	L10 2		E51	E52	E53	U
G	U	L03	L23	L43	L63	L83	L10 3		E61	E62	E63	U
H	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Cuadro 12. Lecturas de absorbancia originales para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los *pools* de mutantes de *L. sphaericus* obtenida mediante Biotek ELx800.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.115	0.079	0.102	0.069	0.076	0.078	0.097	0.074	0.081	0.076	0.085	0.058	425
B	0.084	0.864	1.072	1.098	3.492	2.238	1.789	0.064	3.499	3.442	3.525	0.075	425
C	0.087	0.868	1.126	0.958	1.219	2.152	3.374	0.062	3.5	3.387	3.394	0.097	425
D	0.084	0.798	2.772	1.253	1.417	3.249	3.024	0.059	3.521	3.493	3.505	0.126	425
E	0.087	1.202	1.278	1.423	1.014	2.585	3.462	0.061	1.886	1.936	1.848	0.075	425
F	0.078	1.281	1.034	2.473	1.489	3.544	3.579	0.056	0.949	0.957	0.925	0.074	425
G	0.075	1.066	0.979	1.977	1.111	1.978	2.331	0.05	0.819	0.802	0.818	0.088	425
H	0.122	0.116	0.104	0.08	0.074	0.072	0.075	0.068	0.068	0.07	0.082	0.062	425

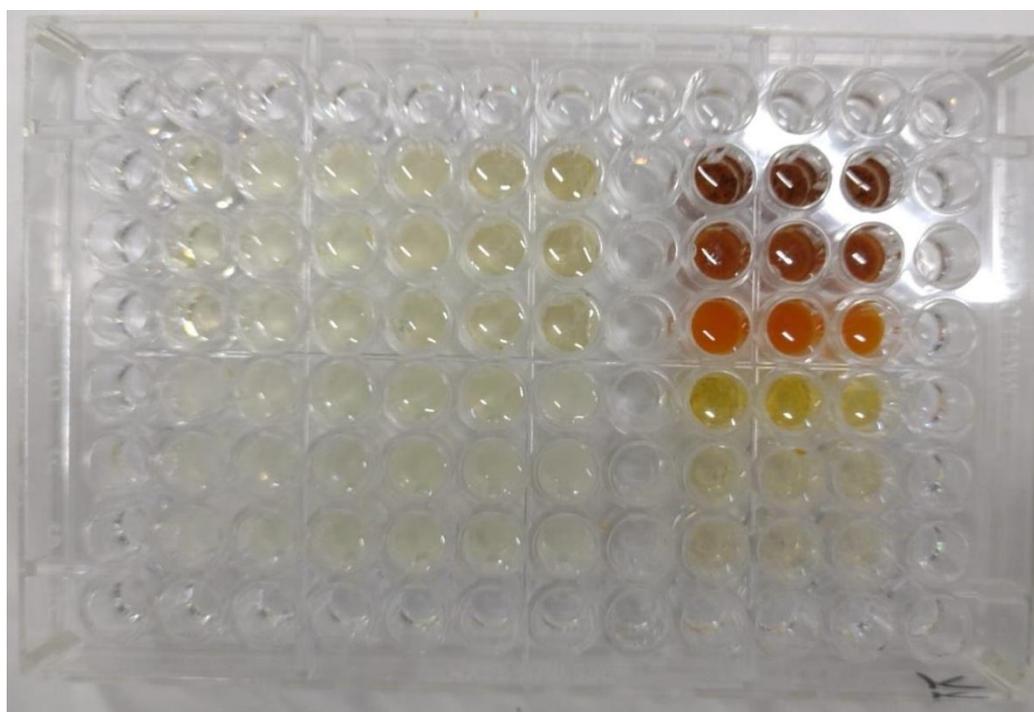


Figura 18. Prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los *pools* de mutantes de *L. sphaericus*.

Cuadro 13. Mapa de carga para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los *pools* de mutantes de *K. oxytoca*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
B	U	B1	K11	K31	K51	K71	K91		E11	E12	E13	U
C	U	B1	K12	K32	K52	K72	K92		E21	E22	E23	U
D	U	B1	K13	K33	K53	K73	K93		E31	E32	E33	U
E	U	K01	K21	K41	K61	K81	K101		E41	E42	E43	U
F	U	K02	K22	K42	K62	K82	K102		E51	E52	E53	U
G	U	K03	K23	K43	K63	K83	K103		E61	E62	E63	U
H	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Cuadro 14. Lecturas de absorbancia originales para la prueba cuantitativa para la producción de amonio por parte de los *pools* de mutantes de *K. oxytoca* obtenida mediante Biotek ELx800.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.048	0.057	0.082	0.053	0.059	0.055	0.059	0.051	0.049	0.053	0.056	0.048
B	0.05	0.815	1.255	1.372	1.418	1.029	1.264	0.048	3.226	3.234	3.237	0.054
C	0.047	0.675	1.13	1.37	1.617	1.104	1.276	0.048	3.201	3.227	3.224	0.054
D	0.048	0.744	1.068	1.258	1.487	1.045	1.169	0.05	3.253	3.233	3.244	0.058
E	0.048	1.994	1.126	1.146	1.273	1.315	1.219	0.048	1.804	1.703	1.346	0.059
F	0.051	2.006	0.951	1.036	1.438	1.222	1.245	0.049	0.773	0.752	0.73	0.052
G	0.076	1.798	1.139	1.159	1.26	1.02	0.902	0.053	0.653	0.621	0.573	0.053
H	0.057	0.06	0.063	0.046	0.051	0.052	0.049	0.049	0.048	0.056	0.061	0.096

425
425
425
425
425
425
425
425

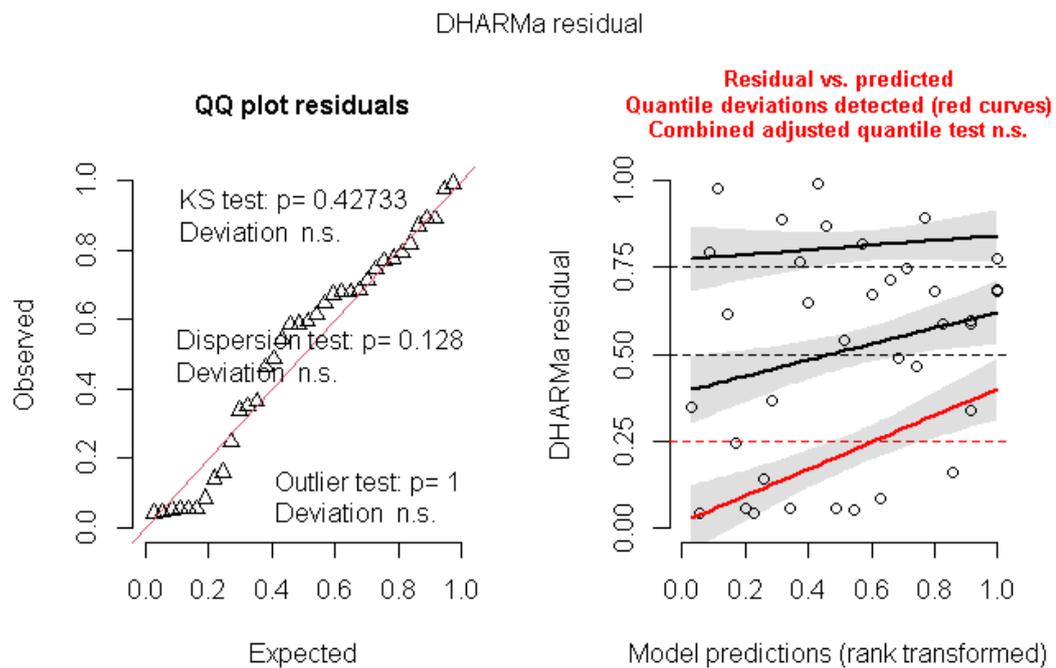


Figura 19. Diagnóstico de residuales para modelos de regresión jerárquicos (multinivel/mixtos) (DHARMA) para el modelo más parsimonioso para describir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas.

Overdispersion test

dispersion ratio = 1.267
Pearson's Chi-Squared = 39.292
p-value = 0.146

No overdispersion detected.

Figura 20. Prueba de sobredispersión para el modelo más parsimonioso para describir el porcentaje de supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas.

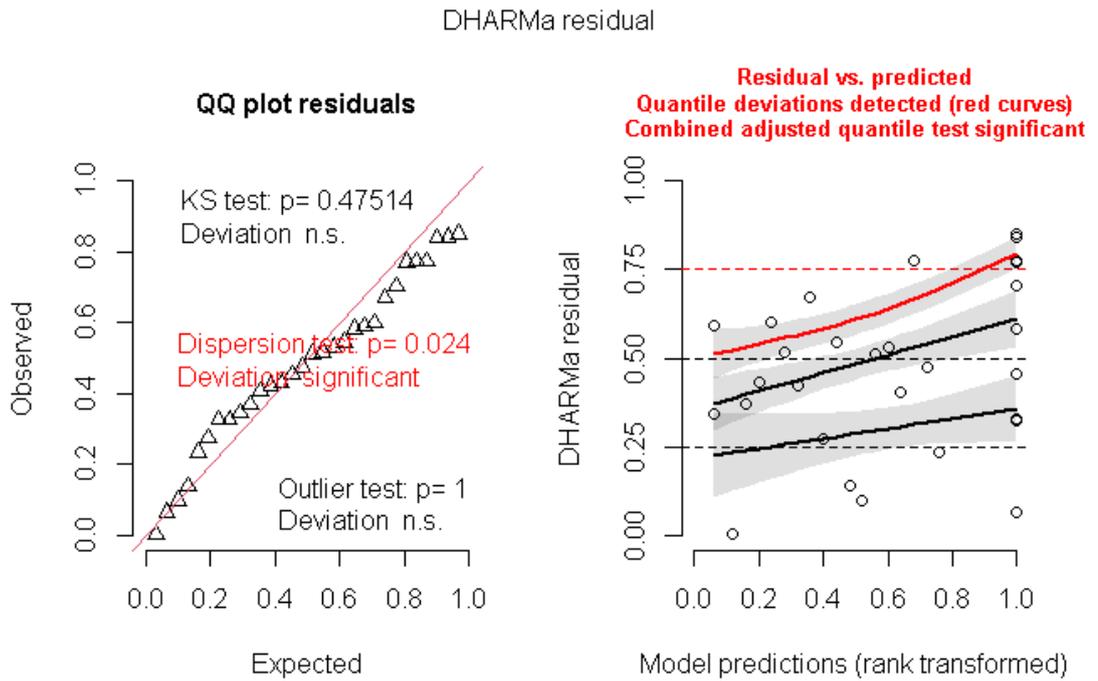


Figura 21. DHARMA para el modelo más parsimonioso para describir la presencia de crecimiento de *L. sphaericus*.

```

dispersion ratio = 0.002
Pearson's Chi-Squared = 0.055
p-value = 1

```

No overdispersion detected.

Figura 22. Prueba de sobredispersión para el modelo más parsimonioso para describir la presencia de crecimiento de *L. sphaericus*.

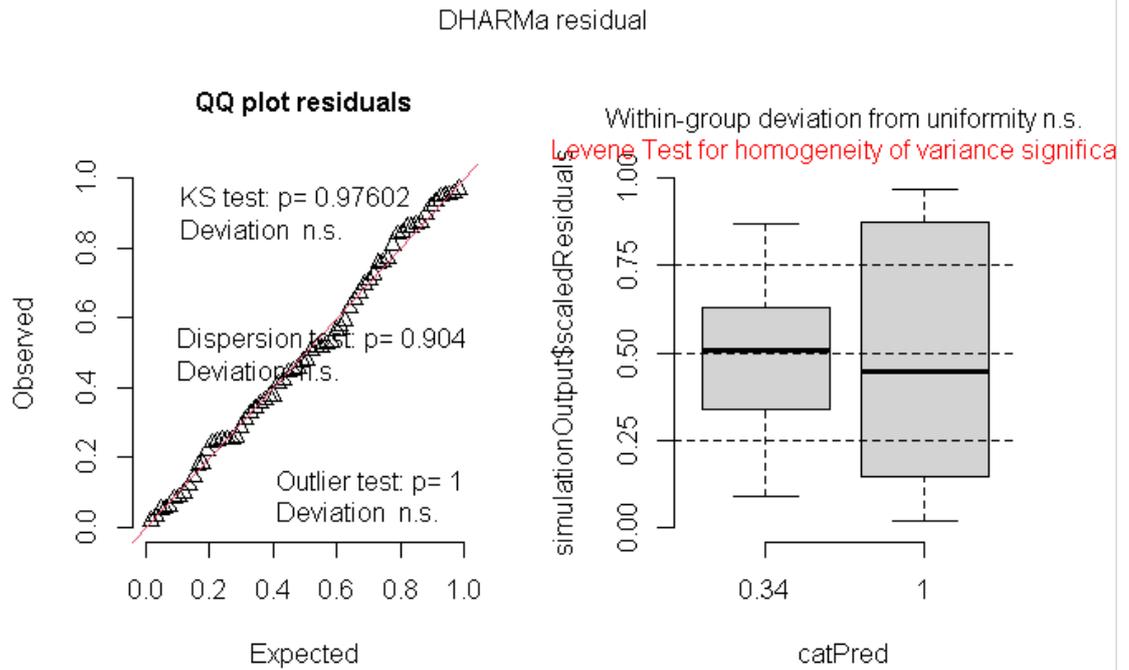


Figura 23. DHARMA para el modelo seleccionado para evaluar la producción de amonio por los mutantes evaluados

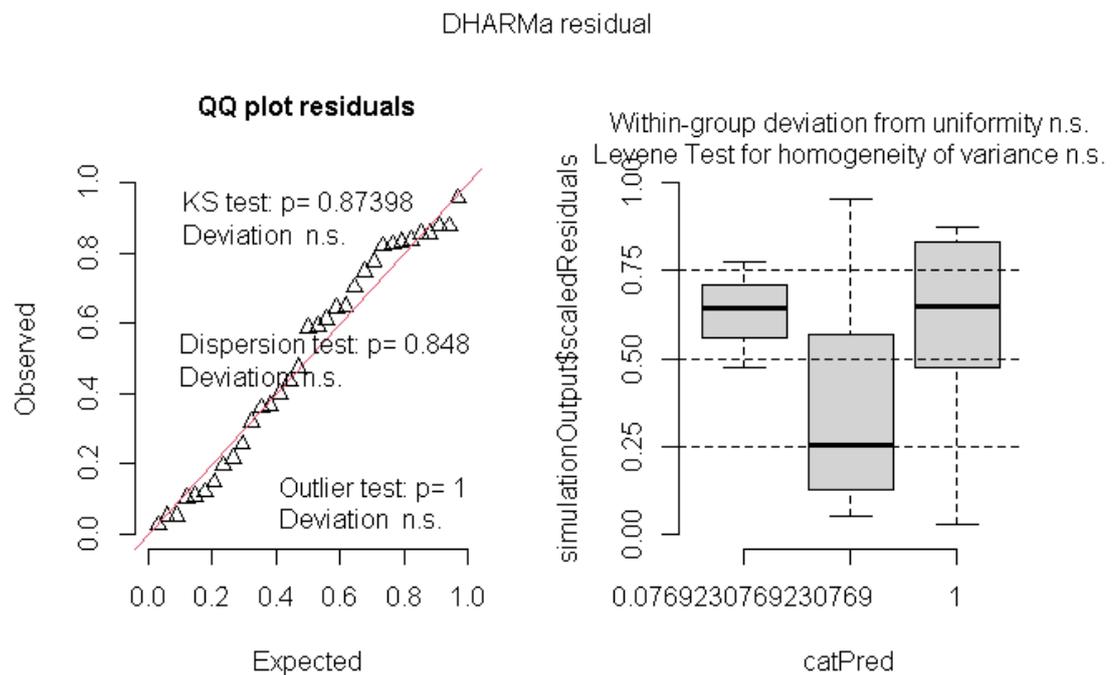


Figura 24. DHARMA para el modelo seleccionado para evaluar la producción de amonio por los pools de mutantes de *L. sphaericus* evaluados

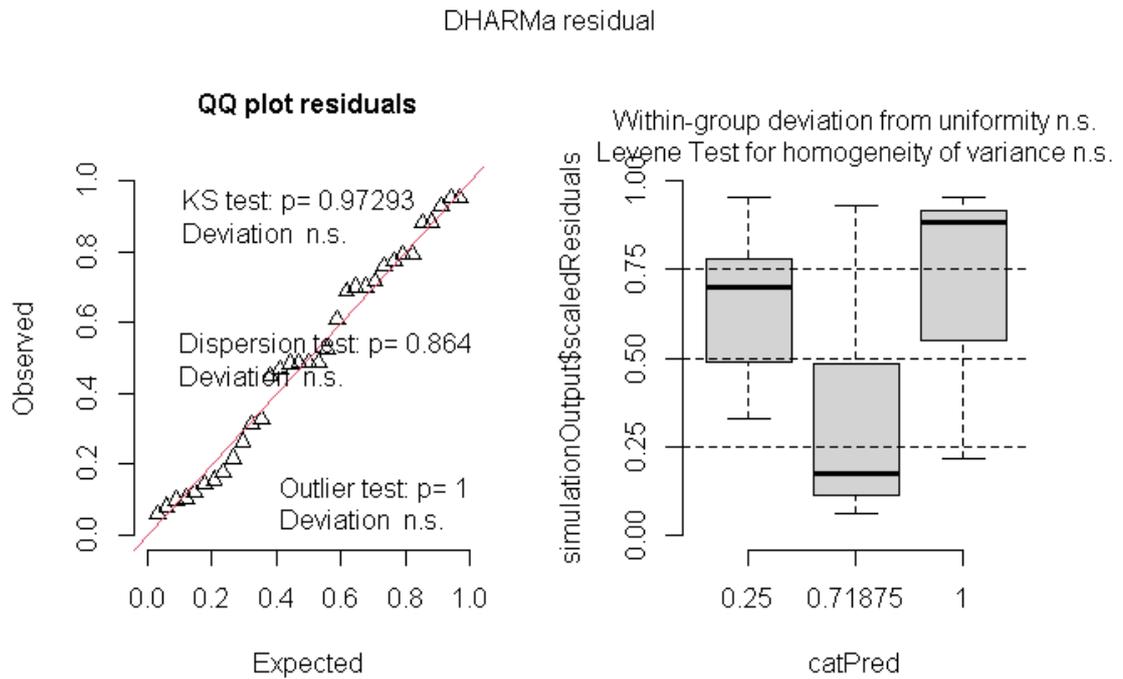


Figura 25. DHARMa para el modelo seleccionado para evaluar la producción de amonio por los pools de mutantes de *K. oxytoca* evaluados

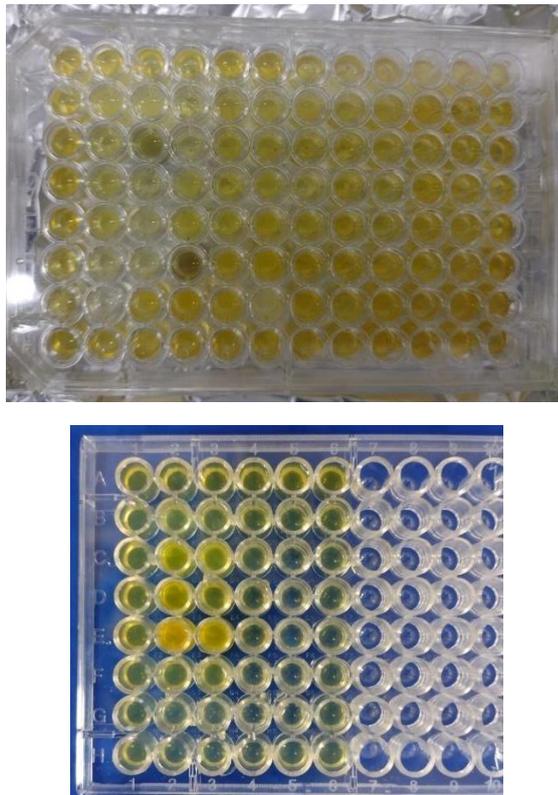


Figura 26. Screening inicial para seleccionar las bacterias fijadoras de nitrógeno con medio selectivo libre de cafeína.



Figura 27. Screening inicial para seleccionar las bacterias fijadoras de nitrógeno con medio selectivo con cafeína al 0.3%.

Anexo 14. Script utilizado para el analisis estadistico de la supervivencia de las bacterias Gram negativas evaluadas

```
library(dplyr)
library(readxl)
library(ggplot2)
library(MASS)
library(MuMIn)
library(DHARMA)
library(lme4)
library(nlme)
library(lattice)
library(bpnreg)
library(RColorBrewer)
library(RCurl)
library(plyr)
library(scales)
```

```

library(ggpubr)
library(jtools)
library(pscl)
library(blmecco)
library(vegan)
library(glmTMB)
library(ZIM)
library(performance)

#Ingreso de datos
data <- read_excel("C:/Users/Julio/Desktop/Tesis/gramnegativas.xlsx")
View(data)
str(data)
data$ID <- as.factor(data$ID)
data$Especie <- as.factor(data$Especie)
str(data)
ggplot(data, aes(y= Porcentaje, x= Especie, fill = Especie)) +
  geom_boxplot()
source("C:/Users/Julio/Desktop/HighstatLibV10.R")
Var <- c("Tiempo", "Especie")
pairs(data[,Var], lower.panel = panel.smooth,
       upper.panel = panel.cor,
       diag.panel = panel.hist)

#Evaluación de VIF
Var1 <- c("Tiempo", "Especie")
corvif(data[,Var1])
cand.models1 <- list()
cand.models1[["Completo"]] = glmer(`Porcentaje` ~ Tiempo + Especie + (1|ID),
family=poisson, data = data, na.action=na.fail)
cand.models1[["Tiempo"]] = glmer(`Porcentaje` ~ Tiempo + (1|ID), family=poisson,
data = data, na.action=na.fail)
cand.models1[["Especie"]] = glmer(`Porcentaje` ~ Especie + (1|ID), family=poisson,
data = data, na.action=na.fail)

```

```

cand.models1[["Nulo"]] = glmer(`Porcentaje` ~ 1 + (1|ID), data = data,
family=poisson, na.action=na.fail)

dredge.out<-model.sel(cand.models1,rank="AICc")

dredge.out

subset(dredge.out,delta<2)

#Validación del mejor modelo del grupo 1

Modelo <- glmer(`Porcentaje` ~ Tiempo + Especie + (1|ID), family=poisson, data =
data, na.action=na.fail)

summary(Modelo)

options(scipen=999) #notación científica

summary(Modelo)

confint(Modelo) #intervalos de confianza

simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo, plot = T) #prueba
DHARMA residual

plot(Modelo)

check_overdispersion(Modelo)

#hay sobredispersión, se cambia la distribución

cand.models2 <- list()

cand.models2[["Completo"]] = glmmTMB(`Porcentaje` ~ Tiempo + Especie + (1|ID),
family=poisson, ziformula=~1, data = data, na.action=na.fail)

cand.models2[["Tiempo"]] = glmmTMB(`Porcentaje` ~ Tiempo + (1|ID),
family=poisson, ziformula=~1, data = data, na.action=na.fail)

cand.models2[["Especie"]] = glmmTMB(`Porcentaje` ~ Especie + (1|ID),
family=poisson, ziformula=~1, data = data, na.action=na.fail)

cand.models2[["Nulo"]] = glmmTMB(`Porcentaje` ~ 1 + (1|ID), data = data,
family=poisson, ziformula=~1, na.action=na.fail)

dredge.out<-model.sel(cand.models2,rank="AICc")

dredge.out

subset(dredge.out,delta<2)

```

```

Modelo2 <- glmmTMB(Porcentaje ~ Tiempo + Especie + (1|ID), family=poisson,
ziformula=~1, data = data, na.action=na.fail)

summary(Modelo2)

options(scipen=999) #notación científica

summary(Modelo2)

confint(Modelo2) #intervalos de confianza

simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo2, plot = T) #prueba
DHARMa residual

plot(Modelo2)

check_overdispersion(Modelo2)

#no se detecta sobredispersión

# plot

ggplot(data, aes(x= Tiempo, y= Porcentaje, group = Especie, color=Especie)) +
  geom_point() +
  geom_smooth(aes(fill=Especie),method=loess, se=TRUE, size=1)+
  labs(x = "Tiempo", y = "Porcentaje de supervivencia (%)") +
  labs(title="Curva de supervivencia para las bacterias Gram negativas analizadas")+
  theme_pubr()+
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0))+
  xlab("Tiempo de exposición a radiación UV(s))+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 180))+
  scale_x_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 5.5))+
  scale_fill_manual(name="Especie",
                    labels = c(substitute(paste(italic("K. oxytoca"))),
                               substitute(paste(italic("P. aeruginosa")))),
                    values = c("Klebsiella"="pink",
                               "Pseudomonas"="skyblue"))+
  scale_color_manual(name="Especie",
                    labels = c(substitute(paste(italic("K. oxytoca"))),

```

```
substitute(paste(italic("P. aeruginosa"))),  
values = c("Klebsiella"="pink",  
           "Pseudomonas"="skyblue"))
```

Anexo 15. Script utilizado para el analisis estadistico de la supervivencia de *L. sphaericus*

```
library(dplyr)  
library(readxl)  
library(ggplot2)  
library(MASS)  
library(MuMIn)  
library(DHARMA)  
library(lme4)  
library(nlme)  
library(lattice)  
library(bpnreg)  
library(RColorBrewer)  
library(RCurl)  
library(plyr)  
library(scales)  
library(ggpubr)  
library(jtools)  
library(pscl)  
library(blmecco)  
library(vegan)  
library(glmmTMB)  
library(ZIM)  
library(performance)  
#Ingreso de datos  
data <- read_excel("C:/Users/Julio/Desktop/lysijuntos.xlsx")  
View(data)  
str(data)
```

```

data$ID <- as.factor(data$ID)
data$Crecimiento <- as.factor(data$Crecimiento)
str(data)

ggplot(data, aes(y= Crecimiento, x= Tiempo, fill = Crecimiento)) +
  geom_violin() +
  labs(x = "Tiempo de exposición a radiación UV (s)", y =
substitute(paste("Crecimiento de ", italic("L. sphaericus")))) +
  theme_classic()+
  labs(title=substitute(paste("Crecimiento de ", italic("L. sphaericus"), " tras
exposición a radiación UV")))+
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 1))+
  scale_x_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 5.5))

cand.models1 <- list()
cand.models1[["Completo"]] = glmer(`Crecimiento` ~ Tiempo + (1|ID),
family=binomial, data = data, na.action=na.fail)
cand.models1[["Nulo"]] = glmer(`Crecimiento` ~ 1 + (1|ID), family=binomial ,data =
data, na.action=na.fail)
dredge.out<-model.sel(cand.models1,rank="AICc")
dredge.out
subset(dredge.out,delta<2)
#Validación del mejor modelo del grupo 1
Modelo <- glmer(`Crecimiento` ~ Tiempo + (1|ID), family=binomial, data = data,
na.action=na.fail)
summary(Modelo)
options(scipen=999) #notación científica
summary(Modelo)
confint(Modelo) #intervalos de confianza
simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo, plot = T) #prueba
DHARMa residual
plot(Modelo)
levels(data$Crecimiento)

```

```
check_overdispersion(Modelo)
```

Anexo 16. Script utilizado para el análisis estadístico de la cuantificación de nitrógeno en los *pools* de mutantes generados para las especies evaluadas.

```
library(dplyr)
```

```
library(readxl)
```

```
library(ggplot2)
```

```
library(MASS)
```

```
library(MuMIn)
```

```
library(DHARMA)
```

```
library(lme4)
```

```
library(nlme)
```

```
library(lattice)
```

```
library(bpnreg)
```

```
library(RColorBrewer)
```

```
library(RCurl)
```

```
library(plyr)
```

```
library(scales)
```

```
library(ggpubr)
```

```
library(jtools)
```

```
library(pscl)
```

```
library(blmecco)
```

```
library(vegan)
```

```
library(glmmTMB)
```

```
library(ZIM)
```

```
library(performance)
```

```
data <- read_excel("C:/Users/Julio/Desktop/cuantificacion junta.xlsx")
```

```
View(data)
```

```
str(data)
```

```
data$ID <- as.factor(data$ID)
```

```
data$Especie <- as.factor(data$Especie)
```

```
data$Pool <- as.factor(data$Pool)
```

```

str(data)

ggplot(data=data, aes(x= Pool, y= ConcugmL, fill=Pool)) +

  geom_boxplot()+

  labs(title=substitute(paste("Cuantificación de amonio para mutantes de ", italic("K.
oxytoca y L. sphaericus"), " generados")), x = "Pool", y = "Concentración de amonio
(ug/mL)")+

  geom_point(stat="identity", fill="steelblue")+

  scale_x_discrete(limits=c("Blanco", "Control K", "K1", "K2", "K3", "K4",
"K5", "K6", "K7", "K8", "K9", "K10",
                        "Control L", "L1", "L2", "L3", "L4", "L5", "L6", "L7", "L8", "L9",
"L10"))+

  theme(plot.title=element_text(hjust=0.5, size=20))+

  theme_pubr()+

  theme(axis.title = element_text(size = 15))+

  theme(axis.text.x = element_text(size = 10))+

  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 225))

row.has.na <- apply(data, 1, function(x){ any(is.na(x))})

sum(row.has.na)

data <- data[!row.has.na,]

any(is.na(data))

data$Tiempo = as.factor(data$Tiempo)

#NMDS

#Creación de objeto con variables a analizar

NMDS1 <- data[,5:ncol(data)]

NMDSm <- as.matrix(NMDS1) #Generación de matriz de distancias

set.seed(123) #Iteraciones para verificar el ordenamiento

NMDSF <- metaMDS(NMDSm, distance = "bray")

#Cálculo del NMDS y visualización de resultados

NMDSF

plot(NMDSF)

#Modificaciones visuales para resultado final de NMDS

data.scores = as.data.frame(scores(NMDSF))

```

```

data.scores$ConcugmL = data$ConcugmL
data.scores$Tiempo = data$Tiempo
data.scores$Especie = data$Especie
head(data.scores)
#Gráfico final
NMDSPLOT <- ggplot(data.scores, aes(x = NMDS1, y = NMDS2)) +
  geom_point(size = 4, aes(colour = Tiempo, shape = Especie))+
  theme(axis.text.y = element_text(colour = "black", size = 12, face = "bold"),
        axis.text.x = element_text(colour = "black", face = "bold", size = 12),
        legend.text = element_text(size = 12, face="italic", colour = "black"),
        legend.position = "right", axis.title.y = element_text(face = "bold", size = 14),
        axis.title.x = element_text(face = "bold", size = 14, colour = "black"),
        legend.title = element_text(size = 14, colour = "black", face = "bold"),
        panel.background = element_blank(), panel.border = element_rect(colour =
"black", fill = NA, size = 1.2),
        legend.key=element_blank())
NMDSPLOT

data$Tiempo = as.numeric(data$Tiempo)

source("C:/Users/Julio/Desktop/HighstatLibV10.R")
Var <- c("Tiempo", "Especie")
pairs(data[,Var], lower.panel = panel.smooth,
      upper.panel = panel.cor,
      diag.panel = panel.hist)
#Evaluación de VIF
Var1 <- c("Tiempo", "Especie")
corvif(data[,Var1])

cand.models1 <- list()

```

```

cand.models1[["Completo"]] = lmer(ConcugmL` ~ Tiempo + Especie + (1|Pool),
data = data, na.action=na.fail)

cand.models1[["Tiempo"]] = lmer(ConcugmL` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)

cand.models1[["Especie"]] = lmer(ConcugmL` ~ Especie + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)

cand.models1[["Nulo"]] = lmer(ConcugmL` ~ 1 + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)

dredge.out<-model.sel(cand.models1,rank="AICc")

dredge.out
subset(dredge.out,delta<2)

#Validación del mejor modelo del grupo 1

Modelo = lmer(ConcugmL` ~ Tiempo + Especie + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)

summary(Modelo)

options(scipen=999) #notación científica

summary(Modelo)

confint(Modelo) #intervalos de confianza

simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo, plot = T) #prueba
DHARMa residual

plot(Modelo)

#El modelo no se valida, se realizara una transformación logaritmica

conc1<-log(data$ConcugmL)

cand.models2 <- list()

cand.models2[["Completo"]] = lmer(conc1` ~ Tiempo + Especie + (1|Pool), data =
data, na.action=na.fail)

cand.models2[["Tiempo"]] = lmer(conc1` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)

cand.models2[["Especie"]] = lmer(conc1` ~ Especie + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)

cand.models2[["Nulo"]] = lmer(conc1` ~ 1 + (1|Pool), data = data, na.action=na.fail)

```

```

dredge.out<-model.sel(cand.models2,rank="AICc")
dredge.out
subset(dredge.out,delta<2)
#Validación del mejor modelo del grupo 1
Modelo2 = lmer(`conc1` ~ Especie + (1|Pool), data = data, na.action=na.fail)
summary(Modelo2)
options(scipen=999) #notación científica
summary(Modelo2)
confint(Modelo2) #intervalos de confianza
simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo2, plot = T) #prueba
DHARMA residual
#el modelo se valida

```

Anexo 16. Script utilizado para el analisis estadístico de la cuantificación de nitrógeno en los *pools* de mutantes generados para *K. oxytoca*.

```

library(dplyr)
library(readxl)
library(ggplot2)
library(jtools)
library(psc1)
library(blmecco)
library(vegan)
data <- read_excel("C:/Users/Julio/Desktop/Tesis/Cuantificacion amonio kleb.xlsx")
View(data)
str(data)
data$ID <- as.factor(data$ID)
data$Pool <- as.factor(data$Pool)
str(data)
ggplot(data=data, aes(x= Pool, y= ConcugmL, fill=Pool)) +
  geom_boxplot()+
  labs(title=substitute(paste("Cuantificación de amonio para mutantes de ", italic("K.
oxytoca"))), x = "Pool", y = "Concentración de amonio (ug/mL)")+

```

```

scale_x_discrete(limits=c("Blanco", "Control", "K1", "K2", "K3", "K4", "K5", "K6",
"K7", "K8", "K9", "K10"))+
geom_point(stat="identity", fill="steelblue")+
theme(plot.title=element_text(hjust=0.5, size=20))+
theme_pubr()+
theme(axis.title = element_text(size = 15))+
theme(axis.text.x = element_text(size = 10))+
scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 50))
data$Tiempo <- as.factor(data$Tiempo)
ggplot(data=data, aes(x= Tiempo, y= ConcugmL, fill=Tiempo)) +
geom_boxplot()+
labs(title=substitute(paste("Cuantificación de amonio para mutantes de ", italic("K.
oxytoca"))), x = "Tiempo (s)", y = "Concentración de amonio (ug/mL)")+
geom_point(stat="identity", fill="steelblue")+
theme(plot.title=element_text(hjust=0.5, size=20))+
theme_pubr()+
theme(axis.title = element_text(size = 15))+
theme(axis.text.x = element_text(size = 10))+
scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 50))

row.has.na <- apply(data, 1, function(x){any(is.na(x))})
sum(row.has.na)
data <- data[!row.has.na,]
any(is.na(data))

data$Tiempo = as.factor(data$Tiempo)
#NMDS
#Creación de objeto con variables a analizar
NMDS1 <- data[,4:ncol(data)]
NMDSm <- as.matrix(NMDS1) #Generación de matriz de distancias
set.seed(123) #Iteraciones para verificar el ordenamiento

```

```

NMDSF <- metaMDS(NMDSm, distance = "bray")
#Cálculo del NMDS y visualización de resultados
NMDSF
plot(NMDSF)
#Modificaciones visuales para resultado final de NMDS
data.scores = as.data.frame(scores(NMDSF))
data.scores$ConcugmL = data$ConcugmL
data.scores$Tiempo = data$Tiempo
head(data.scores)
#Gráfico final
NMDSPLOT <- ggplot(data.scores, aes(x = NMDS1, y = NMDS2)) +
  geom_point(size = 4, aes(colour = Tiempo))+
  theme(axis.text.y = element_text(colour = "black", size = 12, face = "bold"),
        axis.text.x = element_text(colour = "black", face = "bold", size = 12),
        legend.text = element_text(size = 12, face = "italic", colour = "black"),
        legend.position = "right", axis.title.y = element_text(face = "bold", size = 14),
        axis.title.x = element_text(face = "bold", size = 14, colour = "black"),
        legend.title = element_text(size = 14, colour = "black", face = "bold"),
        panel.background = element_blank(), panel.border = element_rect(colour =
"black", fill = NA, size = 1.2),
        legend.key = element_blank())
NMDSPLOT

data$Tiempo = as.numeric(data$Tiempo)

cand.models1 <- list()
cand.models1[["Completo"]] = lmer(`ConcugmL` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)
cand.models1[["Nulo"]] = lmer(`ConcugmL` ~ 1 + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)
dredge.out <- model.sel(cand.models1, rank = "AICc")
dredge.out

```

```

subset(dredge.out,delta<2)
#Validación del mejor modelo del grupo 1
Modelo <- lmer(ConcugmL` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data, na.action=na.fail)
summary(Modelo)
options(scipen=999) #notación científica
summary(Modelo)
confint(Modelo) #intervalos de confianza
simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo, plot = T) #prueba
DHARMa residual
plot(Modelo)

```

Anexo 17. Script utilizado para el analisis estadístico de la cuantificación de nitrógeno en los *pools* de mutantes generados para *L. sphaericus*

```

library(dplyr)
library(readxl)
library(ggplot2)
library(jtools)
library(pscl)
library(blmecco)
library(vegan)
data <- read_excel("C:/Users/Julio/Desktop/Tesis/Cuantificacion amonio lysi.xlsx")
View(data)
str(data)
data$ID <- as.factor(data$ID)
data$Pool <- as.factor(data$Pool)
str(data)
ggplot(data=data, aes(x= Pool, y= ConcugmL, fill=Pool)) +
  geom_boxplot()+
  labs(title=substitute(paste("Cuantificación de amonio para mutantes de ", italic("L.
sphaericus"))), x = "Pool", y = "Concentración de amonio (ug/mL)")+
  scale_x_discrete(limits=c("Blanco", "Control", "L1", "L2","L3", "L4", "L5","L6",
"L7", "L8", "L9", "L10"))+
  geom_point(stat="identity", fill="steelblue")+

```

```

theme(plot.title=element_text(hjust=0.5, size=20))+
theme_pubr()+
theme(axis.title = element_text(size = 15))+
theme(axis.text.x = element_text(size = 10))+
scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 225))
row.has.na <- apply(data, 1, function(x){ any(is.na(x))})
sum(row.has.na)
data <- data[!row.has.na,]
any(is.na(data))

ggplot(data=data, aes(x= Tiempo, y= ConcugmL, fill=Tiempo)) +
  geom_smooth()+
  labs(title=substitute(paste("Cuantificación de amonio para mutantes de ", italic("L.
sphaericus"))), x = "Tiempo (s)", y = "Concentración de amonio (ug/mL)")+
  geom_point(stat="identity", fill="steelblue")+
  theme(plot.title=element_text(hjust=0.5, size=20))+
  theme_pubr()+
  theme(axis.title = element_text(size = 15))+
  theme(axis.text.x = element_text(size = 10))+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 225))
row.has.na <- apply(data, 1, function(x){ any(is.na(x))})
sum(row.has.na)
data <- data[!row.has.na,]
any(is.na(data))

data$Tiempo = as.factor(data$Tiempo)

#NMDS
#Creación de objeto con variables a analizar
NMDS1 <- data[,4:ncol(data)]
NMDSm <- as.matrix(NMDS1) #Generación de matriz de distancias

```

```

set.seed(123) #Iteraciones para verificar el ordenamiento
NMDSF <- metaMDS(NMDSm, distance = "bray")
#Cálculo del NMDS y visualización de resultados
NMDSF
plot(NMDSF)
#Modificaciones visuales para resultado final de NMDS
data.scores = as.data.frame(scores(NMDSF))
data.scores$ConcugmL = data$ConcugmL
data.scores$Tiempo = data$Tiempo
head(data.scores)
#Gráfico final
NMDSPLOT <- ggplot(data.scores, aes(x = NMDS1, y = NMDS2)) +
  geom_point(size = 4, aes(colour = Tiempo))+
  theme(axis.text.y = element_text(colour = "black", size = 12, face = "bold"),
        axis.text.x = element_text(colour = "black", face = "bold", size = 12),
        legend.text = element_text(size = 12, face = "italic", colour = "black"),
        legend.position = "right", axis.title.y = element_text(face = "bold", size = 14),
        axis.title.x = element_text(face = "bold", size = 14, colour = "black"),
        legend.title = element_text(size = 14, colour = "black", face = "bold"),
        panel.background = element_blank(), panel.border = element_rect(colour =
"black", fill = NA, size = 1.2),
        legend.key=element_blank())
NMDSPLOT

data$Tiempo = as.numeric(data$Tiempo)

cand.models1 <- list()
cand.models1[["Completo"]] = lmer(ConcugmL ~ Tiempo + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)
cand.models1[["Nulo"]] = lmer(ConcugmL ~ 1 + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)
dredge.out <- model.sel(cand.models1, rank = "AICc")

```

```

dredge.out
subset(dredge.out,delta<2)

#Validación del mejor modelo del grupo 1
Modelo <- lmer(`ConcugmL` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data, na.action=na.fail)
summary(Modelo)
options(scipen=999) #notación científica
summary(Modelo)
confint(Modelo) #intervalos de confianza

simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo, plot = T) #prueba
DHARMA residual

plot(Modelo)

#el modelo no se valida, se aplica transformación logaritmica
cuanti <- log(data$ConcugmL)
cand.models2 <- list()
cand.models2[["Completo"]] = lmer(`cuanti` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data,
na.action=na.fail)
cand.models2[["Nulo"]] = lmer(`cuanti` ~ 1 + (1|Pool), data = data, na.action=na.fail)
dredge.out<-model.sel(cand.models2,rank="AICc")
dredge.out
subset(dredge.out,delta<2)

#Validación del mejor modelo del grupo 1
Modelo2 <- lmer(`cuanti` ~ Tiempo + (1|Pool), data = data, na.action=na.fail)
summary(Modelo2)
options(scipen=999) #notación científica
summary(Modelo2)
confint(Modelo2) #intervalos de confianza

simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = Modelo2, plot = T) #prueba
DHARMA residual

```