

---

Inducción de mutagénesis aleatoria por medio de radiación ultravioleta para el mejoramiento de la producción de carbonato de calcio en una cepa de *Lysinibacillus sphaericus* para la formación de bioconcreto

---

José Pablo Aguilar Guzmán





UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

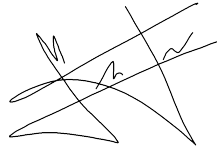


Inducción de mutagénesis aleatoria por medio de radiación ultravioleta para el mejoramiento de la producción de carbonato de calcio en una cepa de *Lysinibacillus sphaericus* para la formación de bioconcreto

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por José Pablo Aguilar Guzmán para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala, 2024

Vo.Bo.:



(f)

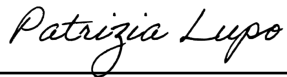
MSc. Julio Roberto Matute

Tribunal Examinador:



(f)

MSc. Julio Roberto Matute



(f)

PhD. Patrizia Lupo



(f)

Licda. Sofia María Cintrón Maegli

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de enero de 2024.

---

## Prefacio

---

Primeramente agradezco a Dios por permitirme culminar el presente trabajo de graduación, así como terminar mi carrera. Este proyecto es parte de una investigación en conjunto del Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala con Cementos Progreso. Además, es la continuación de un proyecto, resultado de la combinación de la investigación académica con la iniciativa privada para el desarrollo de bioconcreto en Guatemala.

Quisiera agradecer a mis padres, quienes han estado a mi lado en todo momento apoyándome y mostrándome su amor, en incontables noches de desvelo y de estudios. Asimismo, agradezco a mi asesor Julio Matute por su orientación y apoyo durante el proceso de realización de mi trabajo. También me gustaría agradecer a la doctora Patrizia Lupo por su apoyo y constante ayuda durante la realización de este trabajo. Me gustaría agradecer a mis catedráticos y catedráticas que me ayudaron en todo momento a formarme tanto académicamente como profesionalmente. En especial a la PhD. Alejandra Zamora, PhD. Diego Archila, PhD. Daniel Ariano, PhD. Krisztina Rios, Licda. Gabriela Croissiert, y Christa Contreras. Agradezco, a su vez, a mis amigos y amigas, quienes me han apoyado y han estado a mi lado en todo momento; en especial, a Rodrigo Vásquez, Andrea Moller, Diego Castillo, Abraham Gutiérrez, Katherine Argueta, Isabella Barillas y Bethel Pinto. Por último, quiero agradecer a mis familiares quienes han estado para mí en todo momento, en especial, a mis abuelos y tíos.

<b>Prefacio</b>	<b>III</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract</b>	<b>IX</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b>	<b>2</b>
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos específicos	2
<b>3 Justificación</b>	<b>3</b>
<b>4 Marco teórico</b>	<b>4</b>
4.1 Cambio climático	4
4.1.1 Causas antropogénicas	4
4.1.2 Efectos generales	5
4.2 Bioconcreto	5
4.3 Biomineralización	5
4.3.1 Precipitación de carbonato de calcio	6
4.3.2 Producción de calcita por metabolismo en <i>L. sphaericus</i>	6
4.3.3 Aplicaciones de la biomineralización	7
4.4 Mejoramiento de metabolismo por inducción de mutaciones	7
4.4.1 Mutagénesis inducida por radiación ultravioleta (UV)	8
4.4.2 Selección de bacterias precipitadoras de carbonato de calcio	9
<b>5 Metodología</b>	<b>10</b>
5.1 Hipótesis	10
5.2 Sitio de estudio	11
5.3 Sujetos de estudio	11
5.4 Enfoque, diseño y tipo de investigación	12

5.5	Tipo y tamaño de muestra	12
5.6	Criterios de inclusión y exclusión	12
5.7	Variables	12
5.8	Materiales y métodos	12
5.8.1	Reactivación de la cepa P.5.3.A de <i>L. sphaericus</i>	12
5.8.2	Purificación y aislamiento de la cepa P.5.3.A de <i>L. sphaericus</i>	13
5.8.3	Mutagénesis inducida por radiación ultravioleta	14
5.8.4	Determinación de la producción de carbonato de calcio	14
5.8.5	Análisis gravimétrico	15
5.8.6	Análisis de estequiometría	15
5.8.7	Análisis estadístico	15
<b>6</b>	<b>Resultados</b>	<b>17</b>
6.1	Purificación y aislamiento de la cepa P.5.3.A de <i>L. sphaericus</i>	17
6.2	Mutagénesis inducida por radiación ultravioleta	18
6.3	Determinación de la producción de carbonato de calcio	19
6.4	Análisis gravimétrico	21
6.5	Análisis de estequiometría	22
6.6	Análisis estadístico	22
<b>7</b>	<b>Análisis de resultados</b>	<b>24</b>
<b>8</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>28</b>
<b>9</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>29</b>
<b>10</b>	<b>Referencias</b>	<b>30</b>
<b>11</b>	<b>Anexos</b>	<b>36</b>
11.1	Figuras suplementarias	36
11.2	Cuadros suplementarios	41
11.3	Script utilizado para el análisis estadístico en RStudio	42

---

## Lista de figuras

---

Figura 1: Reacciones de actividad ureasa	7
Figura 2: Tipos de daños en el ADN inducidos por UV causados por la luz UV-A y UV-B	8
Figura 3: Selección de mutantes por clasificación de células activadas por fluorescencia	9
Figura 4: Esquema de metodología	10
Figura 5: Crecimiento de cepa P.5.3.A en agar sangre	17
Figura 6: Crecimiento y tinción de Gram de cepa P.5.3.A (muestra A)	18
Figura 7: Crecimiento y tinción de Gram de cepa P.5.3.A (muestra B)	18
Figura 8: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento (control)	19
Figura 9: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento (mutada)	19
Figura 10: Coloración de muestra P.5.3.A (1) con eriocromo negro T (con resultado positivo)	20
Figura 11: Coloración de muestras con eriocromo negro T (sin resultado positivo)	21
Figura 12: Diagrama de caja de la producción de carbonato de calcio y dióxido de carbono mineralizado, en función de la presencia de mutación	23
Figura 13: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento control (1)	36
Figura 14: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento control (2)	37
Figura 15: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (1)	37
Figura 16: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (2)	38
Figura 17: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (3)	38
Figura 18: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (4)	39
Figura 19: Cultivo líquido de cepas sobrevivientes a tratamientos	39
Figura 20: Eriocromo negro T utilizado	40
Figura 21: Disposición de tubos dentro del horno	40
Figura 22: Ejemplo de resultado del análisis gravimétrico en la muestra P.5.3.A (5)	41

---

## Lista de cuadros

---

<b>Cuadro 1: Variables a tomar en cuenta</b>	12
<b>Cuadro 2: Resultados de titulación con eriocromo negro T</b>	20
<b>Cuadro 3: Resultados finales de análisis gravimétrico</b>	22
<b>Cuadro 4: Resultados finales de análisis de estequiometría</b>	22
<b>Cuadro 5: Resultados de prueba t</b>	23
<b>Cuadro 6: Resultados de análisis gravimétrico</b>	41
<b>Cuadro 7: Resultados de análisis de estequiometría</b>	41
<b>Cuadro 8: Resultados de prueba Dixon para datos atípicos</b>	42

El concreto es de gran importancia y uno de los principales materiales de la industria de la construcción. Sin embargo, por diversas causas, su agrietamiento es un problema recurrente. Como una alternativa biotecnológica, se creó lo que hoy se conoce como bioconcreto. En estudios previos, se han aislado, caracterizado y evaluado bacterias del género *Lysinibacillus* del suelo de una planta de producción de cemento, con la capacidad de precipitar carbonato de calcio. El objetivo principal de este estudio era llevar a cabo el aumento de producción de carbonato de calcio en una cepa de *Lysinibacillus sphaericus* con actividad ureasa mejorada por medio de mutagénesis aleatoria inducida por radiación ultravioleta. Asimismo, se buscó analizar el consumo de dióxido de carbono por parte de ambas cepas, (mutada y salvaje). También, se logró aislar y purificar la cepa P.5.3.A por medio de agar sangre. Además, se determinó un medio especializado para precipitación de carbonato de calcio específico para la cepa P.5.3.A. Igualmente, se logró diseñar y realizar una selección de mutantes por medio de radiación ultra violeta. Esto dio como resultado una cepa mutada, denominada P.5.3.A.M. Al realizar una prueba t para cada resultado, se obtuvo que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cepa mutada y la cepa salvaje. Se recomienda realizar un análisis estadístico con más muestras para contar con un análisis más certero. Asimismo, se recomienda realizar un análisis genético en ambas cepas para comparar genomas y determinar los genes involucrados en la mutagénesis aleatoria.

---

## Abstract

---

Concrete is of great importance and one of the main materials used in the construction industry. However, for various reasons, cracking is a recurring problem. As a biotechnological alternative, what is known today as bioconcrete was created. In previous studies, bacteria of the *Lysinibacillus* genus have been isolated, characterized and evaluated from the soil of a cement production plant, with the ability to precipitate calcium carbonate. The main objective of this study was to carry out the increase of calcium carbonate production in a *Lysinibacillus sphaericus* strain with enhanced urease activity by means of random mutagenesis induced by ultraviolet radiation. Likewise, the carbon dioxide consumption by both strains (mutated and wild-type) was analyzed. Also, the isolation and purification of strain P.5.3.A was achieved by means of blood agar. In addition, a specialized medium for calcium carbonate precipitation was determined specifically for strain P.5.3.A. Likewise, it was possible to design and carry out a selection of mutants by means of ultra violet radiation. This resulted in a mutant strain, named P.5.3. By performing a t-test for each result, it was obtained that there is no statistically significant difference between the mutated strain and the wild-type strain. It is recommended to perform a statistical analysis with more samples in order to have a more accurate analysis. It is also recommended to perform a genetic analysis on both strains to compare genomes and determine the genes involved in random mutagenesis.

El concreto es un material de construcción que se ha utilizado a lo largo de los años para realizar diferentes tipos de construcciones. Este es un material de construcción muy duro que se genera al mezclar cemento, arena, pequeñas piedras y agua (Cambridge Dictionary, s.f.). El concreto es de suma importancia para la industria de la construcción. Muchas constructoras pueden sufrir grandes retrasos si no cuentan con una fuente de concreto confiable; una situación que retrase la entrega de concreto en masa puede, incluso, retrasar los plazos de construcción en proyectos de suma importancia para una comunidad o nación.

Ha surgido una gran demanda de concreto en la industria de la construcción, lo que, a su vez, ha propiciado el surgimiento de muchas empresas de fabricación de concreto en todo el mundo, siendo China, India y EE. UU. los principales productores. En Guatemala, existen empresas de fabricación de concreto que buscan mejorar la producción y solucionar las problemáticas que presenta.

De los mayores problemas del concreto se encuentran las grietas que se generan debido a la constante exposición a las condiciones climatológicas y ambientales. Un ambiente húmedo, constantes lluvias, el uso constante de la construcción y múltiples desastres naturales pueden causar la degradación y agrietamiento del concreto. No reparar las grietas puede provocar fallos estructurales y sistemáticos en las construcciones, poniendo en riesgo la seguridad personal y de la infraestructura. Sin embargo, a lo largo de los últimos años, se han desarrollado técnicas para tratar de repararlas.

Las técnicas para reparar las grietas son por métodos químicos o mecánicos. Ejemplos son el uso de inyecciones de epoxi; enrutamiento y sellado; “coser” las grietas; perforado y tapado; y aplicar lechada de cemento. El inconveniente con estas es que, a pesar de rellenar las grietas, no ofrecen una solución a largo plazo. Asimismo, estas representan un problema ambiental debido al uso de agentes químicos contaminantes y la producción de dióxido de carbono.

Como una medida de acción más viable, tanto económica como ecológicamente, han surgido técnicas que involucran la biotecnología como una herramienta para desarrollar soluciones más adecuadas. El bioconcreto es un ejemplo de ello, ya que es capaz de reparar las grietas de manera natural y muy eficiente. De igual forma, es una solución mucho más amigable con el ambiente dado que involucra el secuestro de carbono como parte de su forma de trabajar. Aunque esta técnica es de mucha utilidad, no significa que no sea posible mejorarla. Gracias a la biología molecular es posible mejorar su eficiencia.

#### 2.1. Objetivo general

Establecer una metodología para obtener una cepa mutada de *Lysinibacillus sphaericus* con actividad ureasa mejorada por medio de mutagénesis aleatoria, inducida por radiación ultravioleta.

#### 2.2. Objetivos específicos

1. Realizar la purificación y aislamiento de la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus*.
2. Diseñar una selección de mutantes de *L. sphaericus* por medio del mejoramiento de la enzima ureasa.
3. Realizar la selección de mutantes de *L. sphaericus* con ureasa mejorada por medio de radiación ultravioleta.
4. Comprobar la actividad de la enzima ureasa en las cepas mutadas y salvajes de *L. sphaericus*.
5. Medir el consumo de CO<sub>2</sub> por medio de análisis de estequiometría en las cepas mutadas y salvajes de *L. sphaericus*.

---

### Justificación

---

A lo largo del tiempo, el uso del concreto como material de construcción se fue proliferando gracias a sus características de solidez, resistencia y durabilidad (Oficemen; 2017). Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, el cemento se llega a agrietar debido a condiciones climáticas, ambientales y de uso. Sin embargo, el reparar estas grietas en el concreto es altamente costoso y representa un aumento en la huella de carbono, dado que es necesario utilizar cemento para reforzar las grietas.

Como una medida relativamente más económica y ecológica para reparar dichas grietas en el concreto, se ha utilizado a la biotecnología para desarrollar bioconcreto. El bioconcreto se desarrolla por medio de bacterias que utilizan la biomineralización como ruta para generar minerales de interés, como lo es el carbonato de calcio (Seifan, et al; 2015). El carbonato de calcio se genera añadiendo iones calcio a los iones carbonato que genera la bacteria. Se han realizado estudios de bacterias que son capaces de generar carbonato de calcio para ayudar a regenerar las grietas que se generan en el concreto (Heredia; 2019). Las aplicaciones del bioconcreto se extienden desde su utilización en carreteras, hasta estabilización de estructuras. Siendo este de sumo interés para la industria cementera en todo el país de Guatemala, puede llegar a ser utilizado no solo para reparar carreteras, o estructuras de edificios, sino también para reparar estructuras de interés histórico como lo son las ruinas de los sitios arqueológicos.

A pesar de que es una herramienta novedosa y muy eficiente, puede ser mejorada. Se ha estudiado que las bacterias *Lysinibacillus sphaericus* es una de las bacterias que mejor producen el bioconcreto en presencia de calcio en el medio. Utilizando radiación ultravioleta, se busca causar mutaciones aleatorias en el genoma de *L. sphaericus*. Esto con el propósito de poder aumentar la eficiencia y efectividad de la producción de carbonato de calcio. Siendo el carbono uno de los principales compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción, el bioconcreto también demuestra ser una manera muy eficiente de secuestrar carbono y así lograr reducir la huella de carbono.

## 4.1. Cambio climático

El cambio climático se refiere a los cambios a largo plazo en las temperaturas y los patrones climáticos (United Nations, 2020). El clima de la tierra ha tenido muchos cambios a través de la historia. En los últimos 800,000 años han existido ocho ciclos de eras glaciares y periodos más cálidos. Con el final de la última era glacial, hace aproximadamente 11.700 años, se marcó el comienzo de la era climática moderna y de la civilización humana. La mayoría de estos cambios climáticos se han atribuido a las pequeñas variaciones en la órbita de la tierra. Estas han modificado la cantidad de energía solar que recibe el planeta, lo que genera esos ciclos de clima y temperatura (NASA, 2023).

Éste se atribuye a muchas causas tanto naturales como antropogénicas. La emisión de gases de efecto invernadero ha aumentado a lo largo de los años. Esta contribuye al aumento del cambio climático, y se ha causado por el uso de energía no sostenible, uso indiscriminado de la tierra, estilos de vida y patrones de consumo y producción a lo largo de las regiones, y los países (IPCC, 2023).

### 4.1.1. Causas antropogénicas

El cambio climático y las actividades antropogénicas han alterado la dinámica de los ecosistemas terrestres en todo el mundo (Bejagam & Sharma, 2022). Los gases de efecto invernadero son esenciales para la vida en la tierra. Sin embargo, las emisiones que causan los humanos en la atmósfera atrapan y disminuyen la pérdida de calor al espacio. Entre los gases de efecto invernadero se encuentran el dióxido de carbono, óxido nítrico, metano, clorofluorocarbonos, y vapores de agua; siendo el dióxido de carbono el de mayor impacto. El dióxido de carbono es liberado en la atmósfera por medio de procesos naturales, como erupciones volcánicas, y por medio de actividades humanas, como la quema de combustibles fósiles y la deforestación (U.S.Global Change Research Program, 2023). Las actividades humanas han aumentado la cantidad de CO<sub>2</sub> en la atmósfera en un 50 % desde que comenzó la Revolución Industrial (1750). Este fuerte aumento de CO<sub>2</sub> es el factor más importante del cambio climático durante el último siglo (Oreskes, 2004).

El sector de la construcción y la edificación es responsable de aproximadamente el 40 % del consumo mundial de energía, el 40 % de las emisiones de gases de efecto invernadero, el 25 % del agua y el 40 % del consumo mundial de recursos (Caldas *et al.*, 2022). El cemento y el hormigón

son los materiales industriales más utilizados en el mundo. La industria del cemento por sí sola es responsable del 5-8% de las emisiones globales de CO<sub>2</sub> (Scrivener *et al.*, 2018).

#### 4.1.2. Efectos generales

La mayoría de los efectos del calentamiento global son causados por el hombre y son irreversibles. La temperatura global está en aumento, los océanos se calientan, las capas de hielo se reducen, los glaciares están desapareciendo, la capa de nieve se disminuye, el nivel del mar está en aumento, el hielo marino del Ártico está disminuyendo, los eventos naturales están aumentando su frecuencia, la acidificación del océano está en aumento, los rangos geográficos de plantas y animales están cambiando, y las plantas y los árboles están floreciendo antes. (Santer *et al.*, 1996).

La gravedad de los efectos causados por el cambio climático dependerá de la trayectoria de las futuras actividades humanas. Mientras más emisiones de gases de efecto invernadero se liberen, más extremos climáticos y efectos dañinos se darán en todo el planeta. Sin embargo, esos efectos futuros dependen de la cantidad total de dióxido de carbono que se emiten. Por esta razón, al intentar reducir las emisiones, se puede evitar algunos de los peores efectos.

### 4.2. Bioconcreto

Debido a la constante exposición a las condiciones climatológicas y ambientales. Un ambiente húmedo, constantes lluvias, el uso constante de la construcción, y múltiples desastres naturales pueden llegar a causar la degradación y agrietamiento del concreto. Estas grietas llevan a una reducción bastante significativa en la vida útil del concreto y altos costos de reemplazo (Zhu & Dittrich, 2016).

A lo largo de los últimos años, se han desarrollado técnicas para tratar de reparar las grietas. Estas son por métodos químicos o mecánicos. Ejemplos son el uso de inyecciones de epoxi, enrutamiento y sellado, “coser” las grietas, perforado y tapado, y aplicar lechada de cemento. El inconveniente con estas técnicas es que, a pesar de poder rellenar estas grietas, no ofrecen una solución a largo plazo. Así mismo, estas representan un problema ambiental debido al uso de agentes químicos contaminantes y la producción de dióxido de carbono (The Constructor: Building ideas, 2012).

Una manera de poder capturar carbono y a la misma vez generar una solución para la industria de la construcción, es el bioconcreto. Este es un enfoque de autorreparación microbiana que se distingue por su potencial para la reparación de grietas de manera activa, rápida y duradera; además de ser amigable con el medio ambiente (Seifan *et al.*, 2016).

Se ha aprovechado la incorporación de bacterias a la matriz del concreto a partir de la bioprecipitación de minerales, con el objetivo de cerrar poros y fisuras. Así, las bacterias son consideradas un agente autorreparador de las fisuras del hormigón, pues tienen la capacidad de precipitar minerales que cierran las fisuras de forma autónoma (Jonkers *et al.*, 2010).

### 4.3. Biomineralización

La biomineralización es un proceso por el cual materia orgánica se combina con materia inorgánica bajo la regulación de los organismos vivos (Estroff, 2008). La biomineralización es un fenómeno generalizado que conduce a la formación de biominerales organizados, lo que se refiere a la formación de minerales inorgánicos en los organismos (Addadi & Weiner, 2014).

En la naturaleza, los procesos de biomineralización están muy extendidos en diferentes ambientes e involucran microorganismos de diferentes taxonomías y con diversas rutas metabólicas. Los carbonatos, fosfatos, silicatos, sulfatos, sulfuros, óxidos o hidróxidos junto con una variedad de cationes

como  $\text{Ca}_2^+$ , Fe,  $\text{Mg}_2^+$  y  $\text{MnO}_2$  forman biominerales a través de la actividad microbiana (Castro-Alonso *et al.*, 2019).

### 4.3.1. Precipitación de carbonato de calcio

En las últimas décadas, se ha estudiado e incorporado un proceso metabólico bacteriano conocido como “Precipitación de carbonato de calcio inducida por microorganismos”. Este proceso metabólico bacteriano ha surgido como un método alternativo para reducir el costo y el impacto ambiental en la industria cementera (Zhu & Dittrich, 2016). En la precipitación de carbonato de calcio inducida por microbios, la formación de minerales de carbonato de calcio es el resultado de la interacción entre diferentes subproductos metabólicos, e iones de calcio presentes en el microambiente (Achal *et al.*, 2015).

La transformación de  $\text{CO}_2$  en un carbonato mineral precipitado a través de una ruta de carbonatación mineral *ex situ* se considera una opción prometedora para la captura y almacenamiento de carbono debido a que el  $\text{CO}_2$  capturado puede almacenarse permanentemente y los desechos industriales se pueden reciclar y convertir en materiales de carbonato de valor agregado al controlar los polimorfos y las propiedades de los carbonatos minerales (Smit *et al.*, 2014). Los polimorfos y las propiedades fisicoquímicas del  $\text{CaCO}_3$  dependen en gran medida de las variables de síntesis, como la temperatura, el pH de la solución, el tiempo de reacción, la concentración y proporción de iones, la agitación y la concentración de aditivos (Chang *et al.*, 2017).

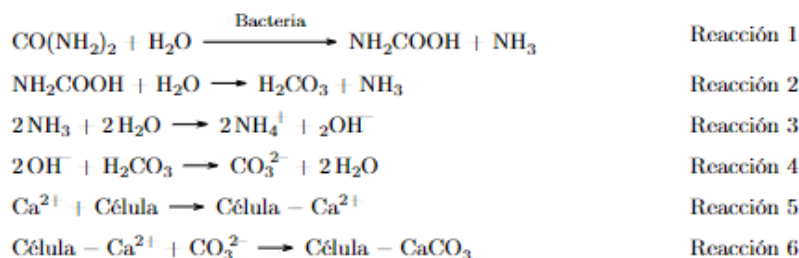
### 4.3.2. Producción de calcita por metabolismo en *L. sphaericus*

El carbonato de calcio se produce de manera extracelular por medio de dos rutas metabólicas, la ruta autotrófica y la ruta heterótrofa (Seifan *et al.*, 2016). La vía autotrófica ocurre en presencia de dióxido de carbono para el cual los microorganismos convierten el dióxido de carbono en carbonato a través de tres formas distintas: metanogénesis no metilotrónica (por arqueas metanogénicas); fotosíntesis oxigénica (por cianobacterias) y fotosíntesis anoxigénica (por bacterias púrpura) (Castanier *et al.*, 1999). La vía heterótrofa ocurre en diferentes géneros de bacteria como *Bacillus*, *Arthrobacter*, y *Rhodococcus*.

Estas bacterias utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía. Basándose en las sales y las fuentes de carbono presentes en el medio, estas bacterias pueden producir varios cristales como el carbonato de calcio y el carbonato de magnesio (Seifan *et al.*, 2016). Las actividades metabólicas microbianas conducen a un aumento de la concentración de carbonato y del pH (Pacheco-Torgal & Labrincha, 2013). El aumento del pH facilita la transformación del dióxido de carbono en carbonato (Wang *et al.*, 2014). Estas conversiones metabólicas promueven la precipitación de carbonato de calcio (principalmente en la forma estable de calcita que abunda en la naturaleza) que desempeña el papel de barrera y bloquea la entrada de productos químicos corrosivos en las grietas (Dick *et al.*, 2006).

*Lysinibacillus sphaericus* puede llevar a cabo este proceso por medio de la actividad ureasa. Así como se puede observar en la Figura 1, un mol de ácido carbámico ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ) y un mol de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se producen por la hidrólisis de urea (reacción 1). El ácido carbámico se hidroliza y produce un mol de ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) y un mol extra de amoníaco (reacción 2). El amoníaco reacciona con el agua del medio y produce iones hidróxido (reacción 3). Estos iones reaccionan con el ácido carbónico y produce carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (reacción 4). Los iones de calcio cargados positivamente pueden unirse a la célula bacteriana cargada negativamente (reacción 5). Los iones de calcio pueden ser proporcionados por fuentes internas que están disponibles en la estructura del cemento o agregando productos químicos como cloruro de calcio, nitrato de calcio o lactato de calcio externamente (reacción 6).

Figura 1: Reacciones de actividad ureasa



(Dhami *et al.*, 2017; Chou *et al.*, 2008; Castro-Alonso *et al.*, 2019)

### 4.3.3. Aplicaciones de la biomineralización

La técnica de precipitación de carbonato de calcio inducida por microorganismos se ha aplicado para la producción de un material que se puede usar como relleno en caucho y plásticos, partículas fluorescentes en tinta de papelería y un marcador fluorescente (Dhami *et al.*, 2013). Asimismo, se ha utilizado para la restauración de cubos de mortero de cemento, la consolidación de arena y la reparación de monumentos de piedra caliza, la reducción de la permeabilidad al agua y los iones de cloruro en el concreto, el relleno de poros y grietas en el concreto, y la mejora de la resistencia de los ladrillos a través de la vía de hidrólisis de la urea (Cheng *et al.*, 2013).

Otras aplicaciones de la biomineralización, ya realizadas o actualmente en desarrollo, han sido categorizadas como “sobre el suelo”, “cercanas al suelo” o “subterráneas”. Las aplicaciones sobre el suelo consisten en productos de construcción biológicos con potencial para reemplazar materiales de alto consumo energético, como el cemento. Las aplicaciones a nivel del suelo consisten en aplicaciones de estabilización superficiales y cercanas a la superficie que pueden aumentar la estabilidad del suelo o tratar la contaminación química tóxica. Las aplicaciones subterráneas incluyen, pero no se limitan, al sellado de vías de fuga alrededor de los pozos. Las aplicaciones en construcción, estabilización de suelos y sellado de pozos con fugas son las que más han avanzado, y algunas de ellas se han comercializado; otras tecnologías están a punto de comercializarse (Akyel *et al.*, 2022).

## 4.4. Mejoramiento de metabolismo por inducción de mutaciones

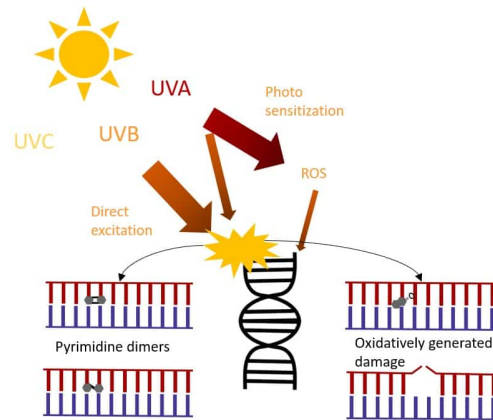
La ingeniería metabólica se define como la mejora de las actividades celulares mediante la manipulación de las funciones enzimáticas, de transporte y reguladoras de la célula con el uso de técnicas genéticas (Raghavendran *et al.*, 2020). Asimismo, se define mutagénesis como el proceso por el cual los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de un organismo cambian, lo que resulta en una mutación genética (Durland & Hamid Ahmadian-Moghadam, 2022). Existe la mutagénesis aleatoria y dirigida:

- La mutagénesis dirigida involucra métodos *in vivo* e *in vitro*, que buscan extraer de manera eficiente genes esenciales y mutaciones que generan microorganismos con fenotipos mejorados o funciones especializadas (Zheng *et al.*, 2017).
- La mutagénesis aleatoria puede ocurrir de manera endógena o exógena. En el caso de los métodos exógenos existe la radiación ionizante, la radiación ultravioleta, agentes alcalinos y aminos aromáticas, toxinas, e inserción de ADN exógeno (Durland & Hamid Ahmadian-Moghadam, 2022).

#### 4.4.1. Mutagénesis inducida por radiación ultravioleta (UV)

La mutagénesis aleatoria basada en UV es un enfoque alternativo para aislar mutaciones de interés con el potencial de solo cambios de un solo nucleótido (Bose, 2016). Esta se puede realizar de manera natural o de manera artificial. La luz ultravioleta se encuentra entre 100 y 400 nm, con la radiación más dañina en longitudes de onda más bajas (Durland & Hamid Ahmadian-Moghadam, 2022).

**Figura 2: Tipos de daños en el ADN inducidos por UV causados por la luz UV-A y UV-B**



(Jean-Luc Ravanat et al., 2001)

La luz ultravioleta daña el ADN por transferencia de energía directa e indirecta (a moléculas cercanas). El daño UV ocurre a través de dos tipos distintos de mutaciones:

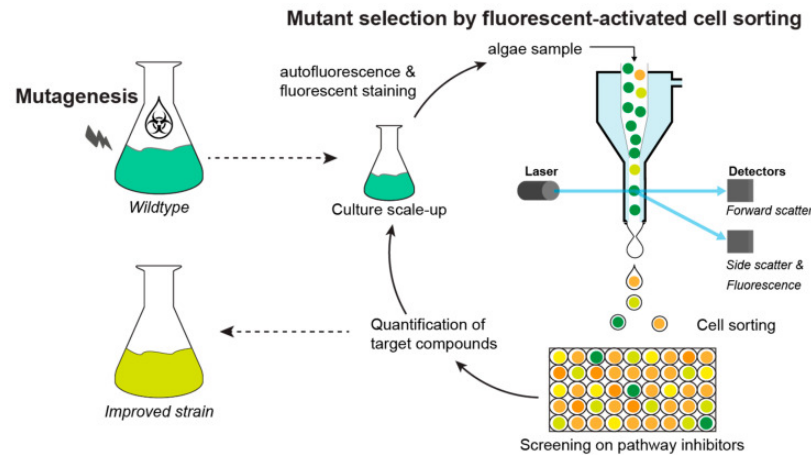
1. **Mutaciones dimerizantes:** la exposición a los rayos UV-B y, en menor medida, a los rayos UV-A conduce a la formación de los productos fotoquímicos más comunes en el ADN: dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD), así como fotoproductos de pirimidina (6-4) y pirimidona (64PP). Los CPD se forman cuando dos pirimidinas adyacentes (timinas, TT o citosinas, CC) se unen covalentemente por sus dobles enlaces C=C. Estos cuatro carbonos forman un anillo cíclico (ciclobutano) que une a las dos pirimidinas, creando así un intermedio químico que normalmente no se encuentra en el ADN. Este producto fotoquímico provoca una torcedura estructural en el ADN que evita que las pirimidinas se apareen y evita la replicación del ADN. A diferencia de las mutaciones oxidativas, las mutaciones de dimerización inducidas por UV surgen de la absorción directa de fotones UV (Figura 2) (Durland & Hamid Ahmadian-Moghadam, 2022).
2. **Mutaciones oxidativas:** la exposición a los rayos UV no siempre conduce directamente a mutaciones en el ADN. De hecho, la radiación UV-A comúnmente daña el ADN de una manera dependiente del oxígeno que implica fotosensibilización. Esto conduce a la producción de un radical libre que luego interactúa con las bases de ADN y las oxida. Estas bases oxidadas no se emparejan correctamente durante la replicación, lo que da lugar a mutaciones (Figura 2) (Chatterjee & Walker, 2017).

Este método ha demostrado ser una técnica que logra modificar deliberadamente las mutaciones de ADN. Esto puede producir bibliotecas de genes mutantes, proteínas, cepas de bacterias u otros organismos genéticamente modificados (Li *et al.*, 2020).

#### 4.4.2. Selección de bacterias precipitadoras de carbonato de calcio

Al buscar de adaptar las cepas a las condiciones de cultivo, el objetivo debe ser inducir una alta tasa de mutaciones puntuales, sin crear fenotipos fuertemente aberrantes y destruir vías celulares completas (Tillich et al., 2012). El resultado de la mutagénesis aleatoria es la generación de cientos de colonias mutantes. Sin embargo, solo una pequeña porción de ellos tiene el fenotipo deseado; por lo tanto, a menudo es necesario un método de detección eficaz.

**Figura 3: Selección de mutantes por clasificación de células activadas por fluorescencia**



En la Figura 3 se puede observar la mutagénesis aleatoria y canalización de selección de mutantes de alto rendimiento utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la detección de inhibidores de vías (Trovão *et al.*, 2022)

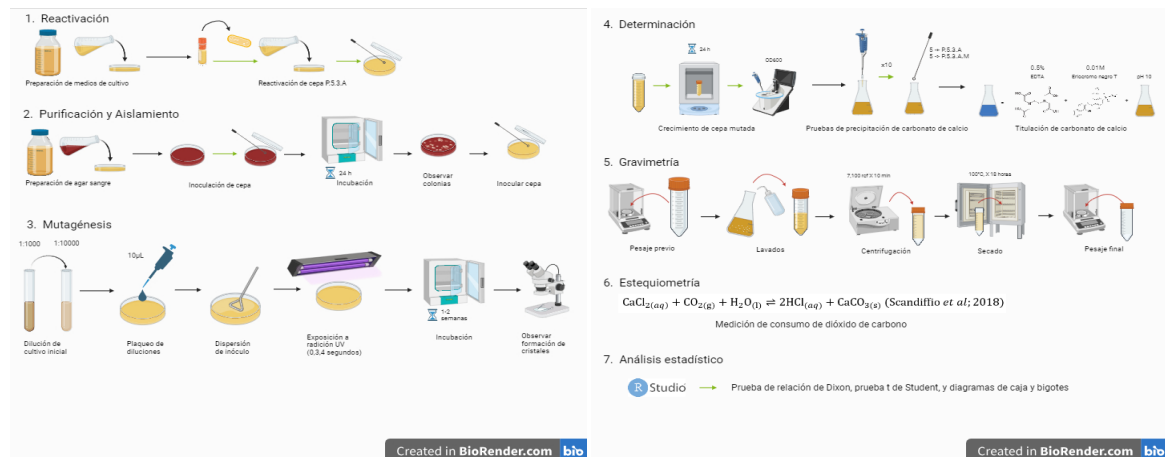
Los mutantes se pueden seleccionar a través de diferentes propiedades, como apariencia visual, autofluorescencia o rendimiento de crecimiento medido por absorbancia. En el caso de mutagénesis aleatoria en microalgas: los tamaños grandes y los diferentes colores de las colonias son buenos indicadores de cepas mutantes de crecimiento rápido, así como de cambios en el contenido de pigmento, respectivamente (Stefano Cazzaniga *et al.*, 2014). Sin embargo, estas técnicas de detección consumen mucho tiempo, ya que cada colonia debe inspeccionarse individualmente y no conducen necesariamente a la cepa mejorada deseada (Figura 3)(Trovão *et al.*, 2022).

Sin embargo, dependiendo del organismo y de la característica que se busca mejorar por medio de la mutagénesis aleatoria, se debe realizar una selección de mutantes específica para dicha característica. A partir de una población bacteriana de tipo salvaje que es susceptible a agentes como bacteriófagos, diversos fármacos, luz ultravioleta, etc., pueden seleccionarse directamente mutantes que sean resistentes a cualquiera de estos agentes utilizando medios selectivos. Después de la inducción de la mutación con un mutágeno adecuado, se permite que la población tratada crezca en condiciones permisivas durante algún tiempo para permitir la expresión del gen mutante (P, 2016).

Finalmente, el cultivo se diluye en placas en un medio selectivo adecuado que se esperaría que suprimiera completamente el crecimiento de las bacterias de tipo salvaje y permitiría que solo las mutantes crecieran y formaran colonias. Las colonias mutantes se pueden recoger y purificar mediante placas de dilución para obtener clones puros de mutantes(Garg, 2016).

A continuación, la Figura 4 presenta la diagramación de la metodología de este estudio. Cada sección representada corresponde a un objetivo específico.

Figura 4: Esquema de metodología



Fuente: Autoría propia

## 5.1. Hipótesis

### Hi:

La inducción de mutagénesis aleatoria por medio de radiación ultravioleta logrará aumentar la producción de carbonato de calcio en una cepa de *Lysinibacillus sphaericus* para la formación de bioconcreto.

### Ho:

Es posible purificar y aislar la cepa P.5.3.A. de *L. sphaericus*.

**Ha:**

No será posible purificar y aislar la cepa P.5.3.A. de *L. sphaericus*.

**Ho:**

Es posible diseñar una selección de mutantes de *L. sphaericus* por medio del mejoramiento de la enzima ureasa.

**Ha:**

No será posible diseñar una selección de mutantes de *L. sphaericus* por medio del mejoramiento de la enzima ureasa.

**Ho:**

La utilización de luz ultravioleta permitirá realizar la selección de mutantes de *L. sphaericus* con ureasa mejorada.

**Ha:**

La utilización de luz ultravioleta no permitirá realizar la selección de mutantes de *L. sphaericus* con ureasa mejorada.

**Ho:**

Las cepas mutadas tendrán una actividad de la enzima ureasa mayor a la de las cepas salvajes de *L. sphaericus*.

**Ha:**

Las cepas mutadas no tendrán una actividad de la enzima ureasa mayor a la de las cepas salvajes de *L. sphaericus*.

**Ho:**

Las cepas mutadas tendrán un consumo de CO<sub>2</sub> mayor al de las cepas salvajes de *L. sphaericus*.

**Ha:**

Las cepas mutadas no tendrán un consumo de CO<sub>2</sub> mayor al de las cepas salvajes de *L. sphaericus*.

## 5.2. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala, en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, específicamente en el laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología, y el laboratorio del Centro de Estudios en Biotecnología.

## 5.3. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio fueron bacterias de suelo productoras de carbonato de calcio, obtenidas de una planta cementera de Cementos Progreso ubicada en Sanarate, El Progreso. Se utilizó la cepa P.5.3.A como modelo de estudio.

## 5.4. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Esta investigación tuvo un enfoque de modelo combinado dominante, siendo el enfoque cuantitativo el dominante, y un diseño experimental verdadero.

## 5.5. Tipo y tamaño de muestra

Se utilizaron bacterias de la cepa P.5.3.A, muestreada de manera no probabilística por conveniencia.

## 5.6. Criterios de inclusión y exclusión

Se utilizaron las bacterias que sobrevivieron al procedimiento de mutagénesis aleatoria por medio de radiación UV, así como las bacterias que fueron capaces de producir carbonato de calcio luego de dichas mutaciones.

## 5.7. Variables

En la Tabla 1 se pueden observar las variables tomadas en cuenta en el mejoramiento de la producción de carbonato de calcio en la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus* para la formación de bioconcreto por medio de mutagénesis aleatoria por medio de radiación ultravioleta.

**Cuadro 1: Variables a tomar en cuenta**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Tiempo	Tiempo de exposición a la radiación UV	Medida en segundos
Colonias	Número de colonias bacterianas	Medida en números cardinales
Mutación	Presencia de mutación en las bacterias	Presente o ausente
Carbonato de calcio	Precipitación de carbonato de calcio	Medida en gramos
Dióxido de carbono	Cantidad de dióxido de carbono secuestrado	Gramos de dióxido de carbono

## 5.8. Materiales y métodos

### 5.8.1. Reactivación de la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus*

Metodología modificada de Cintrón, 2021:

#### Preparación de medios de cultivo

##### Agar nutritivo

Se pesaron 28g de agar nutritivo y se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Se autoclaveo por 30 minutos a 121°C y 30 psi.

##### Caldo LB

Se pesaron 10g de peptona, 10g de NaCl, y 5g de extracto de levadura para preparar 1L de caldo LB 1X con pH 8. Se autoclaveo por 30 minutos a 121°C y 30 psi.

##### Agar LB

Se siguieron los mismos pasos para la receta de caldo LB y se adicionaron 12g de agar. Se autoclaveo por 30 minutos a 121°C y 30 psi.

### **Caldo LB para bioconcreto**

Se pesaron 5g de peptona, 10g de NaCl, y 2.5g de extracto de levadura para preparar 1L de caldo LB para bioconcreto con pH 8. Se autoclaveo por 30 minutos a 121°C y 30 psi. Se consideró este medio como un medio especial, siendo 0.5X de peptona y extracto de levadura, y 1X de NaCl, solución 2% de urea, y solución 0.001M de cloruro de calcio.

### **Agar LB para bioconcreto**

Se siguieron los mismos pasos para la receta de agar LB pero con las especificaciones del medio especial y se adicionó solución urea 2% y solución CaCl 0.001M. Se autoclaveo el medio previo a las soluciones por 30 minutos a 121°C y 30 psi. Se dejó enfriar a temperatura suficiente para ser manejable el recipiente y se filtraron las soluciones dentro del medio utilizando filtros de bajo campana de flujo laminar. Finalmente se plaquearon cajas Petri y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### **Solución urea 100 %**

Se disolvieron 100g de urea en 100mL de agua destilada y a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron cálculos para obtener una solución del 2% en el volumen dado del medio. Se filtró la solución con un filtro de , bajo campana de flujo laminar sobre el medio.

### **Solución cloruro de calcio 0.001M**

Para realizar un litro de solución, se disolvieron 147.02g de CaCl en 1000mL de agua destilada. Finalmente se realizaron cálculos para obtener una solución del 0.001M en el volumen dado del medio. Se filtró la solución con un filtro de , bajo campana de flujo laminar sobre el medio.

### **Reactivación de cepa con mayor producción de bioconcreto**

Para el estudio se utilizó la cepa P.5.3.A por ser la mayor productora de carbonato de calcio según Heredia, 2019. Se reactivaron las cepas conservadas en glicerol al sembrar una asada en placas de agar LB pH 8 y dejando en incubación a 37°C durante 24 horas.

## **5.8.2. Purificación y aislamiento de la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus***

Metodología modificada de Meng et al., 2023:

### **Aislamiento de cepa P.5.3.A**

Se realizó agar sangre con agar base disuleto en agua destilada. Se autoclaveo el medio por 30 minutos a 121°C y 30 psi. Se dejó enfriar a temperatura suficiente para ser manejable el recipiente y se filtró una solución de sangre 5% dentro del medio utilizando microfiltros bajo campana de flujo laminar. Finalmente se plaquearon cajas Petri, se inocularon con la cepa de trabajo y se dejaron incubar por 24h a 34°C. Luego del tiempo transcurrido, se observó la presencia de la cepa y una prueba de hemólisis positiva. Se tomó una asada de una colonia y se inocularon cajas petri con agar nutritivo. Finalmente se dejaron incubar por 24h a 34°C, se observó la formación de colonias y se realizó una tinción de Gram. Se tomó una azada de la colonia y se resembró en agar nutritivo para observar el crecimiento.

### 5.8.3. Mutagénesis inducida por radiación ultravioleta

Metodología modificada de del Cid, 2022:

#### Irradiación de rayos ultravioleta

Tomando en cuenta el valor de OD600 de los estándar McFarland de 0.05, se prepararon diluciones de 1:1000 y 1:10000 con caldo LB. Se sirvieron 10  $\mu$ L de cada dilución en una caja Petri con 2 divisiones con agar LB para bioconcreto. Tomando en cuenta tiempos de exposición de 0, 3 y 4 segundos. Se realizaron 4 réplicas de los 3 tiempos. Se cargaron las placas en la cabina de descontaminación es UV de forma individual (una caja Petri a la vez). Se administró la radiación UV en los tiempos especificados, siendo el tiempo 0 el grupo control. Para proteger las muestras de la luz directa luego de irradiarlas se utilizó papel aluminio para envolverlas. Se incubaron por una semana y se revisó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

### 5.8.4. Determinación de la producción de carbonato de calcio

Metodología modificada de Heredia, 2019 y Morales, 2021:

#### Crecimiento de cepas mutadas

Se inocularon dos tubos cónicos de 50 ml con 40 ml de caldo LB con una azada de la cepa P.5.3.A.M, y una azada de la cepa P.5.3.A. Se incubaron durante la noche en condiciones de agitación (a 130 rpm) a 30°C.

#### Pruebas de precipitación de carbonato de calcio

Se prepararon 10 erlenmeyers de 125 ml con 18 ml de caldo LB para bioconcreto con 2 ml de bacteria. 5 erlenmeyers se utilizaron para la cepa control (P.5.3.A) y 5 erlenmeyers se utilizaron para la cepa mutada (P.5.3.A.M). Se dejaron incubando durante 16 horas en condiciones de agitación (a 180 rpm) a 30°C. Finalmente se colocaron en baño maria los 10 erlenmeyers por 5 minutos.

#### Preparación de solución Eriocromo negro 0.5 %

Se pesaron 0.5g de eriocromo negro T, y se transfirió a un erlenmeyer de 250 ml. Se disolvió con 100 ml de alcohol etílico al 95 %. Adicionalmente se pesaron 4.5g de clorhidrato de hidroxilamina y se adicionaron a la solución. Se adicionaron 100 ml de alcohol etílico al 95 %, suficiente para realizar una solución de 200 ml de Eriocromo Negro T 0.5 %.

#### Titulación de carbonato de calcio

Se titularon los erlenmeyers 1 de cada cepa y el 2 de la cepa salvaje, de la siguiente forma:

1. Ajustar pH a 10 de cada erlenmeyer para la titulación utilizando NaOH.
2. Tomar alícuota de 1 ml y centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto.
3. Transferir sobrenadante a un beaker de 25 ml, añadir entre 2 y 3 gotas de eriocromo negro 0.5 % y titular con EDTA 0.01M hasta alcanzar un color azul del indicador.

\*Pasos 2 y 3 se realizaron con cada repetición, antes de titular la muestra completa.

4. Tomar la muestra restante y agregar entre 2 y 3 gotas de eriocromo negro 0.5 % y titular con EDTA 0.01M hasta alcanzar un color azul del indicador.
5. Calcular la precipitación total de carbonato de calcio en base al volumen de EDTA agregado al cambio de color.

\*Pasos 4 y 5 se realizaron con cada repetición.

Tomando en cuenta que el EDTA forma un complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$  en una proporción 1:1 en estas condiciones, se utilizó la siguiente ecuación para determinar los gramos de carbonato de calcio:

$$\text{Gramos de CaCO}_3 = \text{ml EDTA} * \left(\frac{0.01\text{milimol}}{1\text{ml}}\right) * \left(\frac{0.01\text{mol EDTA}}{1\text{milimol EDTA}}\right) * \left(\frac{1\text{mol Ca}^{2+}}{1\text{mol EDTA}}\right) * \left(\frac{1\text{mol CaCO}_3}{1\text{mol Ca}^{2+}}\right) * \left(\frac{100.0869\text{g CaCO}_3}{1\text{mol CaCO}_3}\right)$$

### 5.8.5. Análisis gravimétrico

#### Medición de peso seco

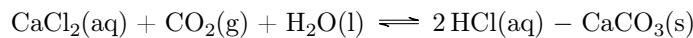
Se transfirió el contenido de los erlenmeyers 2 de la cepa mutada, y 3, 4 y 5 de cada cepa a tubos cónicos de 50 mL previamente etiquetados y pesados. Se realizaron lavados con agua destilada y se rasparon las paredes de los erlenmeyers con una espátula. Todos los tubos cónicos se llevaron a un peso homogéneo de 55g. Se centrifugaron a 7,100 ref por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 30 psi. Se colocaron los tubos sin tapadera en un horno a 100°C y se realizaron observaciones cada media hora luego de las primeras 13 horas durante 3 horas. Finalmente se tomaron mediciones cada hora durante dos horas hasta alcanzar un peso constante. Se compararon los pesos iniciales y finales de cada tubo para calcular el peso final de  $\text{CaCl}_2$ .

### 5.8.6. Análisis de estequiometría

#### Medición de consumo de $\text{CO}_2$

Se comparó por medio de estequiometría el consumo de  $\text{CO}_2$  de la cepa mutada y salvaje de *L. sphaericus*.

Se utilizó la siguiente ecuación química para realizar la relación:



(Scandiffio et al., 2018)

También la siguiente ecuación para calcular los gramos de  $\text{CO}_2$ :

$$\text{Gramos de CO}_2 = 0.1832\text{g CO}_2 * \left(\frac{1\text{mol CaCO}_3}{100.0869\text{g CaCO}_3}\right) * \left(\frac{1\text{mol CO}_2}{1\text{mol CaCO}_3}\right) * \left(\frac{1\text{mol CO}_2}{100.0869\text{g CaCO}_3}\right)$$

### 5.8.7. Análisis estadístico

Se realizaron los análisis estadísticos en RStudio, versión 2023.09.1. Se realizó una prueba de relación de Dixon para la detección de valores atípicos previo a realizar una prueba t para verificar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa en la producción de  $\text{CaCO}_3$  y de  $\text{CO}_2$  mineralizado entre la cepa mutada (P.5.3.A.M) y la cepa control (P.5.3.A). Así mismo, se realizaron diagramas de caja para observar patrones generales de respuesta. Para la prueba t, se establecieron las siguientes hipótesis:

Para la producción de carbonato de calcio:

**Ho:**

No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la producción de  $\text{CaCO}_3$  en la cepa mutada y salvaje.

**Ha:**

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la producción de  $\text{CaCO}_3$  en la cepa mutada y salvaje.

Para la cuantificación de dióxido de carbono secuestrado:

**Ho:**

No existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del  $\text{CO}_2$  secuestrado en la cepa mutada y salvaje

**Ha:**

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del  $\text{CO}_2$  secuestrado en la cepa mutada y salvaje.

### 6.1. Purificación y aislamiento de la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus*

Se estableció un método para purificar la cepa de trabajo con agar sangre. En la Figura 5 se puede observar como la cepa P.5.3.A logra crecer y ser aislada en agar sangre. Adicionalmente, se observa la reacción de hemólisis efectuada por esta cepa. En la Figura 6 se muestra el crecimiento de la cepa aislada de agar sangre en un agar nutritivo. Así también se observa la morfología característica de esta cepa y la respectiva tinción de Gram de una colonia categorizada como muestra A. En la Figura 7 se muestra lo mismo, pero con una colonia categorizada como muestra B.

Figura 5: Crecimiento de cepa P.5.3.A en agar sangre

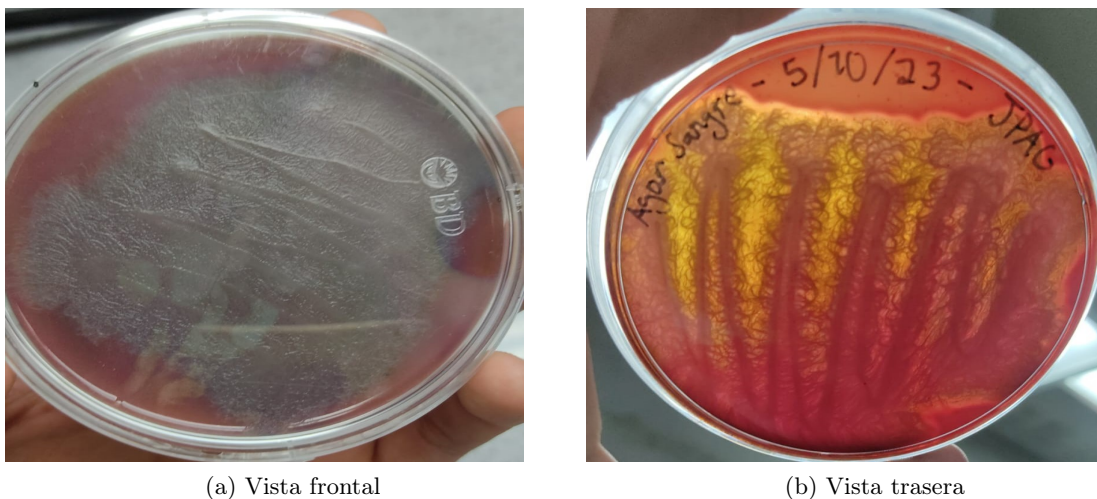
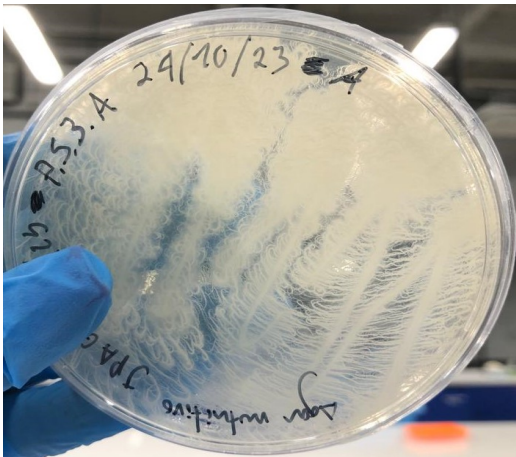


Figura 6: Crecimiento y tinción de Gram de cepa P.5.3.A (muestra A)

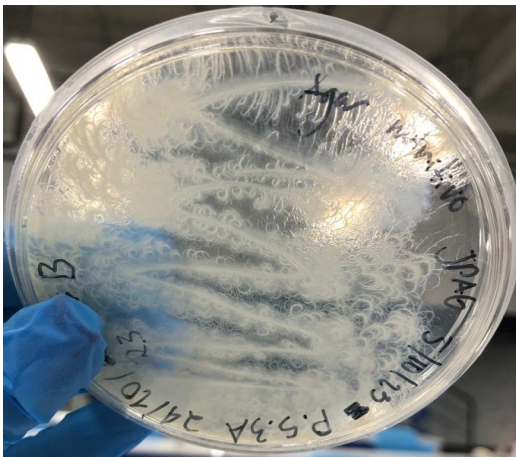


(a) Crecimiento en agar nutritivo



(b) Tinción de Gram (objetivo de inmersión)

Figura 7: Crecimiento y tinción de Gram de cepa P.5.3.A (muestra B)



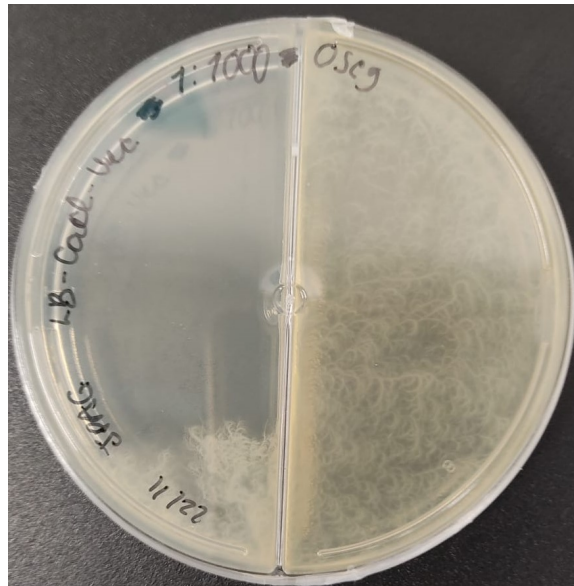
(a) Crecimiento en agar nutritivo



(b) Tinción de Gram (objetivo de inmersión)

## 6.2. Mutagénesis inducida por radiación ultravioleta

Siguiendo la metodología establecida en la sección 5.8.2 de materiales y métodos, se obtuvieron dos colonias que sobrevivieron y crecieron bajo las condiciones de tratamiento y control. En la Figura 8 se puede observar una caja Petri con división sometida al tratamiento control, del lado derecho se observa el crecimiento de la cepa P.5.3.A. En la Figura 9 se puede observar, de la misma manera, una caja Petri con división sometida al tratamiento de exposición a UV por cuatro segundos. Esta cepa se consideró mutada y se renombró como P.5.3.A.M. En ambas figuras se puede observar la morfología característica de esta cepa.

**Figura 8: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento (control)**

Se muestra una caja Petri con división. No se expuso a radiación UV y se inoculó con una dilución 1:1000 del cultivo inicial.

**Figura 9: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento (mutada)**

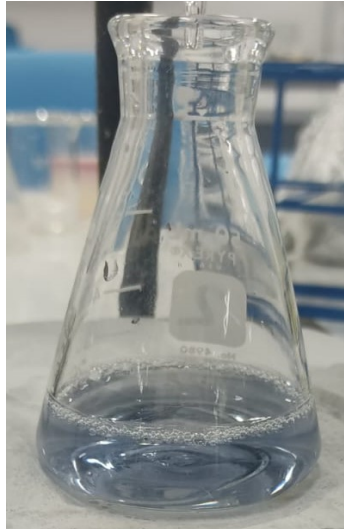
Se muestra una caja Petri con división. Se expuso a radiación UV por cuatro segundos, y se inoculó con una dilución 1:1000 del cultivo inicial.

### 6.3. Determinación de la producción de carbonato de calcio

Siguiendo la metodología establecida en la sección 5.8.3 de materiales y métodos, se realizó la titulación de 3 erlenmeyers, de los cuales solamente uno presentó un resultado positivo. En la Figura 10, se puede observar la titulación de la muestra control P.5.3.A. (1). El color turquesa, luego de añadir el EDTA, indica un resultado positivo. Como se puede observar en el Cuadro 2, se

utilizaron 52.5 ml de EDTA para titular la solución. Con las muestras P.5.3.A.M (1) y P.5.3.A. (2), no se lograron titular según el procedimiento. En la Figura 11, se puede observar una secuencia de imágenes que muestran una problemática con la adición del eriocromo negro T como indicador en las muestras.

**Figura 10: Coloración de muestra P.5.3.A (1) con eriocromo negro T (con resultado positivo)**



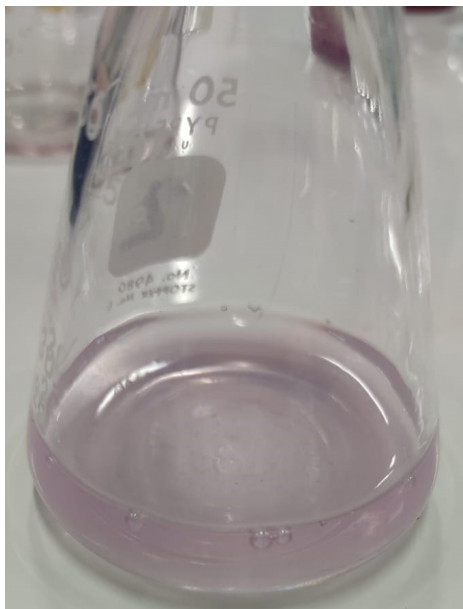
Se muestra el viraje de color a turquesa luego de añadir el volumen de EDTA a la muestra P.5.3.A (1).

**Cuadro 2: Resultados de titulación con eriocromo negro T**

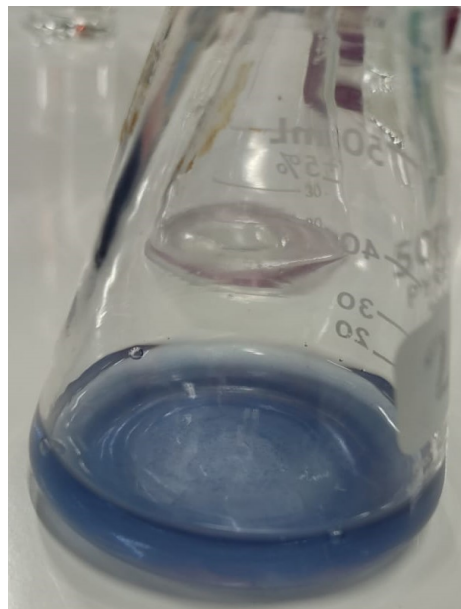
Muestra	Volumen de EDTA utilizado en blanco	Volumen de EDTA utilizado en muestra	Gramos de $\text{CaCO}_3$
P.5.3.A (1)	12.5 ml	52.5 ml	0.04003 g

Se presenta la producción y cuantificación de carbonato de calcio por medio de la titulación con EDTA, utilizando eriocromo negro T como indicador.

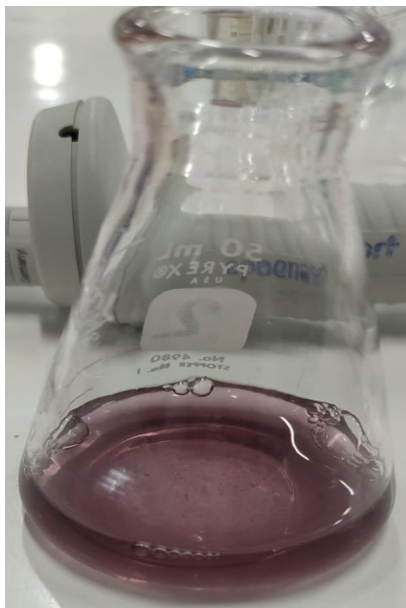
Figura 11: Coloración de muestras con eriocromo negro T (sin resultado positivo)



(a) Coloración con una gota de eriocromo



(b) Coloración con cuatro gotas de eriocromo



(c) Coloración con siete gotas de eriocromo

Se muestran imágenes del cambio de color al añadir las gotas de eriocromo negro a las muestras. Este se considera un resultado negativo y erróneo, considerando que el viraje de color no fue el correcto.

#### 6.4. Análisis gravimétrico

Realizando la metodología establecida en la sección 5.8.4 de materiales y métodos, se determinó el peso seco del carbonato de calcio en las siete muestras restantes. En el Cuadro 3 se puede observar la cepa y el promedio de gramos de carbonato de calcio que se obtuvieron de cada una.

Cuadro 3: Resultados finales de análisis gravimétrico

Cepa	Promedio de $\text{CaCO}_3$ (gramos)
P.5.3.A.M	$0.1391 \pm 0.0860$
P.5.3.A.	$0.0743 \pm 0.0099$

Se presenta el promedio y desviación estándar de carbonato de calcio por medio de gravimetría, utilizando el análisis de peso seco.

## 6.5. Análisis de estequiometría

Al realizar el análisis estequiométrico para la medición del consumo de  $\text{CO}_2$ , según la metodología mostrada en la sección 5.8.5, se obtuvieron los gramos de  $\text{CO}_2$  mineralizados por la precipitación de carbonato de calcio. En el cuadro 4 se muestran los resultados de dicho análisis. Se pueden observar la cepa y promedio de gramos de dióxido de carbono mineralizados.

Cuadro 4: Resultados finales de análisis de estequiometría

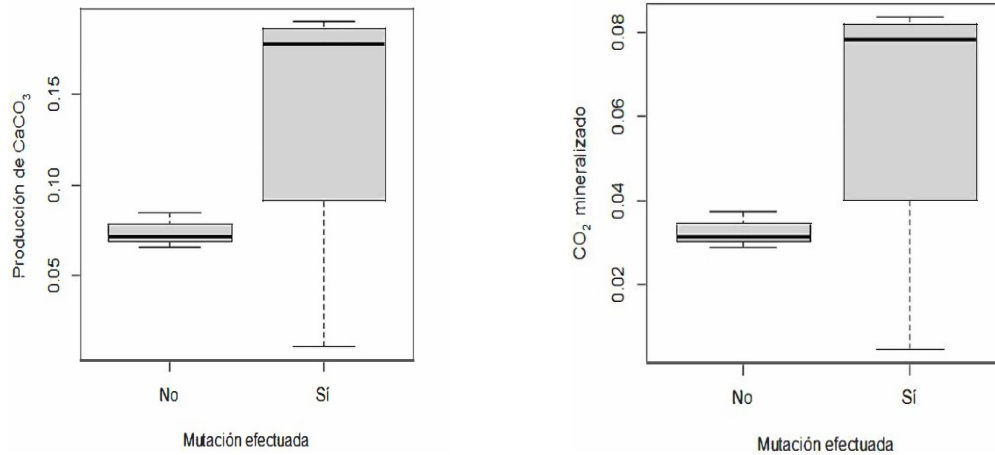
Cepa	Promedio de $\text{CO}_2$ (gramos)
P.5.3.A.M	$0.0611 \pm 0.0378$
P.5.3.A.	$0.0327 \pm 0.0043$

Se presenta el promedio y desviación estándar de la mineralización de dióxido de carbono, utilizando un análisis estequiométrico de la reacción metabólica de *L. sphaericus*.

## 6.6. Análisis estadístico

Con el fin de homogenizar los datos, se realizó una prueba de relación de Dixon para la detección de valores atípicos. Se obtuvo que no habían datos atípicos dentro de las mediciones realizadas, en la sección 11.2 de Cuadros suplementarios se muestra el resultado de la prueba en el cuadro 8. Se realizó un diagrama de caja para confirmar el promedio, la distribución y los datos atípicos de la producción de  $\text{CaCO}_3$  y la mineralización de  $\text{CO}_2$ . En la Figura 12 se muestran dichos diagramas de caja de la producción de  $\text{CaCO}_3$  y el  $\text{CO}_2$  mineralizado. En el cuadro 5 se presentan los resultados de las prueba t realizadas, respecto a la producción de  $\text{CaCO}_3$  y el  $\text{CO}_2$  mineralizado. Se obtuvo que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cepa mutada y la cepa salvaje, tanto en producción de  $\text{CaCO}_3$  como en  $\text{CO}_2$  mineralizado.

Figura 12: Diagrama de caja de la producción de carbonato de calcio y dióxido de carbono mineralizado, en función de la presencia de mutación



(a) Producción de carbonato de calcio en función de la mutación (b) Dióxido de carbono mineralizado en función de la mutación

Se muestran diagramas de caja, en el eje X se encuentra la presencia o ausencia de mutación como tratamiento. En el eje Y se encuentra un rango numérico de (a) la producción de  $\text{CaCO}_3$  y (b) la cantidad de  $\text{CO}_2$  mineralizado.

Cuadro 5: Resultados de prueba t

Resultado	Estadístico t	Grados de libertad	Valor p	Conclusión
Producción de $\text{CaCO}_3$	-1.4937	3.1049	0.2291	No se rechaza la hipótesis que las medias de producción de carbonato de calcio entre distintas cepas son iguales estadísticamente.
Cantidad de $\text{CO}_2$	-1.4934	3.1049	0.2292	No se rechaza la hipótesis que las medias de dióxido de carbono mineralizado entre distintas cepas son iguales estadísticamente.

Se presentan los resultados de la prueba t de Student para la producción de carbonato de calcio y la cantidad de dióxido de carbono, con su respectiva conclusión.

---

## Análisis de resultados

---

Este estudio tenía como objetivo principal establecer una metodología para obtener una cepa mutada de *Lysinibacillus sphaericus* con actividad ureasa mejorada por medio de mutagénesis aleatoria inducida por radiación ultravioleta. Como primer paso, se realizó una purificación y aislamiento de la cepa de trabajo P.5.3.A.

Se utilizó agar sangre como un medio selectivo, tomando en cuenta que la cepa estaba contaminada con cocos Gram-negativos. Se ha demostrado que *L. sphaericus* es una bacteria capaz de crecer de manera rápida y eficiente en agar sangre Columbia (Meng et al., 2023). Según Meng et al., (2023), *L. sphaericus* es un patógeno oportunista; puede estar involucrada en bacteriemia, meningitis, pseudotumores e infecciones alimentarias. En la Figura 5 se puede observar que efectivamente la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus* fue capaz de crecer en agar sangre de manera exitosa. Se pudo observar también la morfología acolochada y filamentosa, característica de esta cepa. Asimismo, se pudo observar que esta cepa tiene una reacción hemolítica. Tomando en cuenta la coloración verdosa en la vista trasera de la caja Petri, es posible confirmar que la cepa lleva a cabo una  $\alpha$  hemólisis (Rojas-Pinzón & Dussán, 2017).

Para confirmar la existencia de un posible riesgo patogénico al momento de utilizar la bacteria en la bioprecipitación de carbonato de calcio, es posible realizar la detección de factores de virulencia específicos, como las exotoxinas. Un método utilizado en estos casos es la serología que prueba la respuesta inmune del organismo (Gilligan, 2013). Tomando en cuenta que *L. sphaericus* es un patógeno humano accidental, bacterias que viven en el ambiente que solamente causan enfermedades cuando estas entran en contacto con la sangre humana (Hossain et al., 2013), es posible seguir considerando esta bacteria como un organismo modelo para su uso en bioconcreto en la industria cementera. Asimismo, es posible obviar el proceso del crecimiento bacteriano y volver el proceso de precipitación de carbonato de calcio en un proceso meramente enzimático. El complejo de la enzima ureasa, juntamente con el resto de reactivos necesarios, colocados en un mortero, pueden llevar a cabo la reacción necesaria para producir carbonato de calcio. Sin embargo, conlleva muchas implicaciones relacionadas a la calidad e integridad de los cristales formados, así como la cinética enzimática, las condiciones óptimas para que la enzima no se desnaturalice o pierda su actividad enzimática.

En las Figuras 6 y 7, se pueden observar dos muestras de la cepa P.5.3.A aisladas del cultivo en agar sangre. Asimismo se pueden observar las respectivas tinciones de Gram que confirman la pureza de la cepa. Dado que *L. sphaericus* es una bacteria Gram-positiva (Meng et al., 2023), es posible confirmar la veracidad de los resultados obtenidos.

Para completar el proceso de mejoramiento de cepas, se seleccionó un método de mutagénesis aleatoria. En las Figuras 8 y 9 es posible observar las únicas colonias sobrevivientes de todos los tratamientos utilizados. La primera figura sirvió como un control en el resto de análisis realizados. La segunda figura sirvió como la muestra mutada en el resto de análisis realizados. Para futuras investigaciones es posible realizar más muestras utilizando dichas condiciones de experimentación para verificar y obtener más posibles cepas mutadas. En el apartado de Anexos 11.1 se pueden observar en las Figuras de la 13 a la 18, todas las cajas petri obtenidas de los tratamientos empleados para la mutagénesis. Ninguna otra aparte de las mencionadas anteriormente lograron mostrar las características morfológicas de la cepa P.5.3.A. Asimismo, en el apartado de Anexos 11.1 se pueden observar en la Figura 19, el cultivo líquido de las cepas sobrevivientes a los tratamientos de mutagénesis aleatoria. Es posible que el uso de una dilución muy grande en el momento de inocular las cajas Petri haya resultado en una menor cantidad de colonias (American Society for Microbiology, 2005). Por lo que se recomienda utilizar un factor de dilución menor. Realizar pruebas con diluciones entre 1:100 (uno en cien) y 1:1000 (uno en mil). De la mano, es muy recomendable realizar conteos celulares de CFUs (Unidades formadoras de colonias) para así poder determinar un estimado de las células esperadas en una dilución dada.

En el estudio de Foda et al., 2013, realizaron una suspensión bacteriana de *L. sphaericus* en solución salina, la cual expusieron a radiación ultravioleta en intervalos de tiempo entre 5 y 60 minutos, con agitación leve a una distancia de 20 cm de una lámpara de UV (254nm) de 15 watts fijada en una cámara oscura. Bajo estas condiciones obtuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 4% para el tiempo de 5 minutos. En el estudio de del Cid, 2022 se realizó de igual manera un estándar McFarland, con la diferencia que se realizaron diluciones seriadas de  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  UFC/mL. Obtuvo colonias aisladas y se observó crecimiento. Se determinó que la probabilidad de supervivencia de *L. sphaericus* aumenta mientras menos se expone la muestra a radiación UV. Por esta razón es recomendable realizar conteos celulares previos para determinar un estimado de posibles sobreviviente. Otra razón por la cual se hayan obtenido pocas mutantes en este estudio sea debido a que el cultivo se haya realizado en un medio sólido y no un medio líquido. Asimismo, es posible que durante las experimentaciones hubieran fluctuaciones y picos de energía en la red eléctrica y por ende se aumentara la intensidad de la radiación UV emitida por el foco de la cabina de descontaminación. Sin embargo, dado que los tiempos de exposición eran demasiado cortos, es posible descartar esta teoría.

Para determinar el éxito de la mutación aleatoria, fue necesario determinar la producción de carbonato de calcio. Para esto se seleccionaron dos métodos analíticos complementarios: la titulación de carbonato con eriocromo negro T y gravimetría de carbonato de calcio. Este procedimiento es utilizado para determinar la dureza total en agua. Es un método colorimétrico que cuantifica las concentraciones totales de iones de calcio y magnesio (National Environmental Methods Index, s.f.). El punto de equivalencia de la reacción se detecta mediante el indicador Eriocromo Negro T, que se torna rojo al entrar en contacto con calcio y magnesio en medio alcalino a  $\text{pH } 10,0 \pm 0,1$  y azul cuando los cationes son mineralizados por EDTA (Hach, 2015). En el apartado de Anexos 11.1 se pueden observar en la Figura 20, el Eriocromo Negro T preparado y utilizado para la titulación. En la Figura 10 se puede observar un resultado positivo para la titulación. En el cuadro 2 se observan los gramos de carbonato de calcio calculados con la ecuación descrita en la subsección 5.8.4 de “Titulación de carbonato de calcio” en la sección 5.8 de “Materiales y métodos”.

En la Figura 11 se puede observar que las titulaciones para las muestras P.5.3.A.M (1) y P.5.3.A (2) no fueron positivas y dieron error a la hora de añadir el EDTA. Es posible que esto se haya debido a que las muestras fueron hervidas para matar a las bacterias en baño María previo a realizar los análisis de cuantificación. Asimismo, que los cationes divalentes de magnesio y calcio son nutrientes

importantes que necesitan las bacterias para el crecimiento y el mantenimiento celular (Wang et al., 2019). Es posible que al inducir una lisis celular, los iones de calcio y magnesio de las células se liberaron en el medio. Provocando así que el complejo del eriocromo con los iones se viera afectado. Otra posible razón sea que al dejar un día de por medio entre mediciones, se volvieron a formar complejos químicos con el calcio y el magnesio. Provocando así que el EDTA no se uniera a los iones libres de calcio del medio. Sin embargo, este método es posible utilizarlo como un método para validar el análisis de gravimetría empleado en este estudio.

En el cuadro 3 se muestran los promedios y desviaciones estándar de la producción de carbonato de calcio obtenidos para cada cepa. Estos datos fueron calculados a partir de los datos obtenidos que se pueden observar en el cuadro 6 en el apartado 11.2 de anexos. Observando los promedios es posible hipotetizar que la cepa mutada logró producir una cantidad de carbonato de calcio mayor a la de la cepa control. Los tubos cónicos con las muestras se colocaron como se puede observar en el apartado de Anexos 11.2 en la Figura 21. Se colocaron de esta manera para lograr una mayor área superficial y así lograr que la humedad se evaporara con mayor velocidad. Asimismo, se mantenían abiertos los tubos para que el vapor pudiera escapar y no se condensara de nuevo en el tubo, afectando así las mediciones. Finalmente, se obtuvieron polvos blancuzcos en cada uno de los tubos, así como se puede observar en la Figura 22 del apartado 11.2 de Anexos. Como un enfoque distinto al propuesto acá, es posible realizar el secado primero por medio de un filtro, un embudo Büchner, y una bomba de vacío, para finalmente utilizar un horno desecador para obtener un peso más exacto. Según Teir et al., 2016, los filtros de tambor al vacío, los filtros de presión horizontal y las centrifugas de cesta son buenos para eliminar líquidos del producto sólido.

La presencia de precipitación de carbonato de calcio en un tiempo de 16 horas, es un indicador que el medio especializado de precipitación de carbonato de calcio establecido en este estudio permite un cambio en el metabolismo de la enzima ureasa comparado con estudios anteriores (Morales, 2021). Al reducir a la mitad la concentración de la peptona y el extracto de levadura, se limita el consumo de la fuente de carbono como un nutriente esencial. Al añadir la urea al medio se está forzando a la bacteria a que utilice la ruta metabólica de la enzima ureasa. Por lo que al añadir el cloruro de calcio, permite que el calcio sea utilizado y esto lleve a la precipitación del carbonato de calcio. Asimismo, este método establecido en este estudio es una posible vía para la serialización de bioprospección de mutantes de *L. sphaericus*. Tomando en cuenta que la bioprospección es la exploración de la biodiversidad en busca de nuevos recursos de valor social y comercial (Beattie et al., 2010). Siendo este un enfoque biotecnológico para la mejora en la industria cementera, la bioproducción de carbonato de calcio representa un avance en la ciencia y tecnología en la construcción. Con la posibilidad de mejorar las producciones y disminuir los costos de producción.

En el apartado 11.3 de anexos se presenta el Script utilizado para el análisis estadístico. Primero se realizó una prueba de valores atípicos de Dixon para verificar que no existiera algún valor atípico. En el cuadro 8 se presenta el resultado de dicha prueba. Se encontró que no existían valores atípicos, por lo que se procedió a realizar una prueba t para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de producción de carbonato de calcio y mineralización de carbono en las cepas P.5.3.A y P.5.3.A.M. Tomando en cuenta que las muestras no estaban homogeneizadas, tres para la cepa control y cuatro para la cepa mutada, se realizó una prueba t de Welch. En esta se asume que las poblaciones de interés se distribuyen normalmente y que las observaciones son independientes dentro y entre muestras. Asimismo, es más confiable cuando las dos muestras tienen varianzas desiguales y posiblemente tamaños de muestra desiguales (Ruxton, 2006). Como se puede observar en el cuadro 5, los valores p para ambos resultados son mayores al valor alfa de 0.05. Esto indica que no se rechazan las hipótesis nula que indican que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de producción de carbonato de calcio y mineralización de dióxido de carbono entre la cepa control y la cepa mutada. Por esta razón es necesario aumentar el número de muestras para así poder obtener un resultado más preciso y robusto estadísticamente.

El estudio se complementó realizando un análisis de estequiometría para determinar así la cantidad de dióxido de carbono mineralizado. Utilizando la ecuación descrita en la subsección 5.8.6

de “Medición de consumo de CO<sub>2</sub>” en la sección 5.8 de “Materiales y métodos”, se obtuvieron los resultados del cuadro 4. Se pueden observar los promedios y desviaciones estándar de los gramos de dióxido de carbono mineralizado durante el proceso de precipitación de carbonato de calcio. Estos datos fueron calculados a partir de los datos obtenidos que se pueden observar en el cuadro 7 en el apartado 11.2 de anexos. De la misma manera que en los resultados del análisis gravimétrico, es posible hipotetizar que la cepa mutada logró mineralizar una cantidad de dióxido de carbono mayor a la de la cepa control. La importancia de este análisis radica en la capacidad que tiene *L. sphaericus* de mineralizar dióxido de carbono durante la precipitación de carbonato de calcio, por medio del metabolismo de la enzima ureasa. Tomando en cuenta que actualmente las tecnologías convencionales de captura de CO<sub>2</sub> suelen ser ineficaces, peligrosas y contribuyen a la contaminación secundaria del medio ambiente. Los sistemas biológicos para la conversión de CO<sub>2</sub>, por otro lado, proporcionan un camino potencial a seguir debido a su alta selectividad y adaptabilidad de aplicaciones. Además, muchas bacterias pueden utilizar el CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono y convertirlo en productos de valor añadido (Onyeaka & Ekwebelem, 2022). La mejora en la producción de carbonato de calcio por parte de la cepa P.5.3.A da como resultado un aumento en la captación de carbono. Lo que le da un valor agregado a esta tecnología e investigación.

A partir de los resultados analizados aquí, es posible hacer recomendaciones a futuros estudios. Estos yacen en la utilización de metodología moleculares y genéticas. Es posible realizar una secuenciación de genoma completo por medio de secuenciación de nueva generación en ambas cepas para determinar así los genes involucrados en la mutagénesis aleatoria, tanto antes como después de la mutagénesis. Esta misma recomendación se puede emplear para realizar un tamizaje previo a los análisis cuantitativos, esto para comprobar que la mutación aleatoria realizada sea en el mecanismo de la enzima ureasa. Se propone la utilización de la secuenciación de nueva generación debido a que esta ofrece un acercamiento más barato y en menor tiempo que las secuenciaciones de tipo Sanger (Illumina, 2020). La secuenciación de Sanger es costosa con aproximadamente \$500/Mb en comparación con el costo menor de \$0,50/Mb para las plataformas NGS (CADTH, 2014). De esta manera sería posible realizar una mutagénesis dirigida para la regulación de las enzimas involucradas en la precipitación de carbonato de calcio en el metabolismo de *L. sphaericus*. De esta misma manera, sería posible identificar posibles islas de patogenicidad y genes que indiquen la liberación de toxinas, que se asumen a raíz de la alfa hemólisis de la cepa P.5.3.A. Abriendo así diferentes líneas de investigación y de aplicaciones tanto para la cepa P.5.3.A como la P.5.3.A.M. Al contar ya con una cepa mutada y con una producción de carbonato de calcio aumentada, es posible ampliar el estudio y llevar a cabo un escalamiento a nivel laboratorio. Así mismo, tomando en cuenta los altos costos de la secuenciación de genoma completo, se recomienda realizar una secuenciación de producto de PCR. Diseñando cebadores específicos para los genes involucrados en la codificación del complejo enzimático ureasa propuestos por Morales (2021).

---

### Conclusiones

---

1. Se estableció una metodología con agar sangre para la purificación y el aislamiento de la cepa P.5.3.A de *L. sphaericus*.
2. Se diseñó una selección de colonias mutantes de *L. sphaericus* por medio del mejoramiento de la enzima ureasa, utilizando la mutagénesis aleatoria basada en radiación ultravioleta como medio.
3. Se realizó una selección de cepas mutantes de *L. sphaericus* por medio de irradiación de rayos ultravioleta por cuatro segundos, con una dilución 1:1000 del cultivo inicial.
4. Se logró establecer un medio especializado para la precipitación de carbonato de calcio mediante el uso de urea como mayor fuente de carbono.
5. Se comprobó la actividad de la enzima ureasa en las cepas mutadas y salvajes de *L. sphaericus* con un medio especializado para precipitación de carbonato de calcio, obteniendo un promedio de producción de  $0.1391 \pm 0.0860$  g y  $0.0743 \pm 0.0099$  g, para las cepas P.5.3.A.M y P.5.3.A, respectivamente.
6. Se midió el consumo de dióxido de carbono por medio de un análisis de estequiometría en las cepas mutadas y salvajes de *L. sphaericus*, obteniendo un promedio de mineralización de  $0.0611 \pm 0.0378$  g y  $0.0327 \pm 0.0043$  g, para las cepas P.5.3.A.M y P.5.3.A, respectivamente.

---

### Recomendaciones

---

1. Los datos del presente estudio se consideran meramente exploratorios. Para obtener un análisis más representativo, para futuras investigaciones, se recomienda aumentar el número de muestras.
2. Para una futura investigación, se recomienda realizar un análisis genético empleando técnicas de secuenciación de nueva generación de genoma completo para determinar los genes mutados en el mecanismo de la enzima ureasa.
3. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la purificación y aislamiento de la cepa, se recomienda realizar estudios sobre islas de patogenicidad en el genoma de la cepa P.5.3.A y sus implicaciones médicas.
4. Se recomienda realizar análisis de patogenicidad sobre la cepa P.5.3.A para determinar el nivel de riesgo que puede presentar sobre el ser humano.
5. Es recomendable realizar un estudio exploratorio sobre la bioprecipitación de carbonato de calcio por medio de un método meramente enzimático.
6. Como un posible paso extra en esta investigación, se recomienda realizar un análisis cinético sobre el crecimiento de la cepa P.5.3.A y P.5.3.A.M en el medio especializado para bioconcreto descrito en este estudio.
7. Se recomienda realizar una comparación en la metodología de titulación de carbonato de calcio propuesta en este estudio y la propuesta por Morales (2021).
8. Para una futura investigación, se recomienda realizar una mutagénesis dirigida al mecanismo de la enzima ureasa de la cepa P.5.3.A.

## Referencias

- 
- Achal, V; Mukherjee, A; Kumari, D; & Zhang, Q. (2015). Biomineralization for sustainable construction: A review of processes and applications. *Earth-Science Reviews*, 148, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2015.05.008>
- Addadi, L; & Weiner, S. (2014). Biomineralization: mineral formation by organisms. *Physica Scripta*, 89(9), 098003. <https://doi.org/10.1088/0031-8949/89/9/098003>
- Akyel, A; Coburn, M; Phillips, A. J; & Gerlach, R. (2022). Key Applications of Biomineralization. *Microbiology Monographs*, 347–387. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80807-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80807-5_10)
- Allen, S; & Thomas, E. (1999). *The Structure of Materials*. John Wiley & Sons. <https://rb.gy/12tjeh>
- American Society for Microbiology. (2005). *Serial Dilution Protocols*. <https://asm.org/Protocols/Serial-Dilution-Protocols>
- Arif, M; Irwan, J; Othman, N; & Alshalif, A. (2021). Review of Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) Sequestration in Bio-Concrete. *Lecture Notes in Civil Engineering*, 129–136. <http://rb.gy/qki6fr>
- Beattie, A; Hay, M; Magnusson, B; Rocky de Nys, Smeathers, J; & Vincent, J. (2010). Ecology and bioprospecting. *Austral Ecology*, 36(3), 341–356. <https://rb.gy/cou1ka>
- Bejagam, V; & Sharma, A. (2022). Impact of climatic changes and anthropogenic activities on ecosystem net primary productivity in India during 2001–2019. *Ecological Informatics*, 70, 101732. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2022.101732>
- Bleisch, R; Freitag, L; Ihadjadene, Y; Sprenger, U; Steingröwer, J; Walther, T; & Krujatz, F. (2022). Strain Development in Microalgal Biotechnology—Random Mutagenesis Techniques. *Life*, 12(7), 961–961. <https://doi.org/10.3390/life12070961>
- Bose, J. (2014). Chemical and UV Mutagenesis. *Methods in Molecular Biology*, 111–115. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2014\\_190](https://doi.org/10.1007/7651_2014_190)

- CADTH, C. A. for D. and T. in H. (2014). Next Generation DNA Sequencing: A Review of the Cost Effectiveness and Guidelines. National Library of Medicine; Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK274072/>
- Caldas, L; Araujo, A; Hasparyk, N; Tiecher, F; Amantino, G; & Filho, R. (2022). Circular economy in concrete production: Greenhouse Gas (GHG) emissions assessment of rice husk bio-concretes. Revista IBRACON de Estruturas E Materiais, 15(6). <https://shorturl.at/STSnv>
- Cambridge Dictionary. (s.f). Concrete. En el Cambridge Dictionary.com. Recuperado el 17 de mayo, 2023 en <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/concrete>
- Castanier, S; Le Métayer-Levrel, G; & Perthuisot, J. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist point of view. Sedimentary Geology, 126(1-4), 9–23. [https://doi.org/10.1016/s0037-0738\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/s0037-0738(99)00028-7)
- Castro, M; Montañez, L; Sanchez, M; Franco, M; Narayanasamy, R; & Balagurusamy, N. (2019). Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. Frontiers in Materials, 6. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>
- Center for Climate and Energy Solutions. (2022). Controlling Industrial Greenhouse Gas Emissions. Center for Climate and Energy Solutions. <https://rb.gy/tghgen>
- Chang, R; Kim, S; Lee, S; Choi, S; Kim, M & Park, Y. (2017). Calcium Carbonate Precipitation for CO2 Storage and Utilization: A Review of the Carbonate Crystallization and Polymorphism. Frontiers in Energy Research, 5. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00017>
- Chatterjee, N; & Walker, G. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. 58(5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Cheng, L; Cord, R; & Shahin, M. (2013). Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation. Canadian Geotechnical Journal. <https://doi.org/10.1139/cgj-2012-0023>
- Chou, C; Aydilek, A; Seagren, E; & Maugele, T. (2008). Bacterially-Induced Calcite Precipitation via Ureolysis. <https://rb.gy/710518>
- Cintrón, S. (2021). Efectividad de tres cepas de bacterias de género *Lysinibacillus* aisladas en una cantera de caliza para la producción de biocemento. Trabajo de graduación en modalidad de tesis para optar al grado de Licenciado en Biotecnología Industrial, Universidad del Valle de Guatemala.
- del Cid, J. (2022). 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 en modalidad de tesis para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.
- Dhami, N. Reddy, M. S; & Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. Frontiers in Microbiology, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00314>
- Dhami, N; Alsubhi, W; Watkin, E; & Mukherjee, A. (2017). Bacterial Community Dynamics and Biocement Formation during Stimulation and Augmentation: Implications for Soil Consolidation. Frontiers in Microbiology, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01267>

- Dick, J; De Windt, W; De Graef, B Saveyn, H; Van der Meeren, P; De Belie, N; & Verstraete, W. (2006). Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 17(4), 357–367. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9006-x>
- Durland, J & Ahmadian, H. (2022). *Genetics, Mutagenesis*. Nih.gov; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/>
- Estroff, L. (2008). Introduction: Biomineralization. *Chemical Reviews*, 108(11), 4329–4331. <https://doi.org/10.1021/cr8004789>
- Foda, M; Moharam, M; & El-Bendary, M. (2013). Overproduction of a mosquitocidal chloramphenicol-resistant *Lysinibacillus sphaericus* mutant obtained through UV irradiation. *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.808738>
- Garg, M. (2016). Isolation of Microbial Mutants: 4 Techniques | Microbiology. *Biology Discussion*. <https://shorturl.at/zYaJJ>
- Gilligan, P. (2013). Identification of Pathogens by Classical Clinical Tests. Springer EBooks, 57–89. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30144-5\\_90](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30144-5_90)
- Global Environment Facility. (2022). Climate Change Mitigation. Global Environment Facility. Extraído de: <https://www.thegef.org/what-we-do/topics/climate-change-mitigation>
- Hach. (2015). Total Hardness of Water by Photocolorimetry. Hach.com. Extraído de: <https://rb.gy/aulzyj>
- Heredia, A. (2019). Determinación de biomineralización a partir de bacterias de suelo y subsiguiente formulación de medio de cultivo a base de desechos industriales para la biorreparación de microgrietas en concreto. Trabajo de graduación en modalidad de tesis para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala
- Hoffmann, T; Paine, K; & Gebhard, S. (2021). Genetic optimisation of bacteria-induced calcite precipitation in *Bacillus subtilis*. 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01704-1>
- Hossain, S; Rahman, N; Balakrishnan, V; Puvanesuaran, V; Sarker, Z; & Kadir, M. (2013). Infectious Risk Assessment of Unsafe Handling Practices and Management of Clinical Solid Waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(2), 556–567. <https://doi.org/10.3390/ijerph10020556>
- Huxford, T. (2013). X-Ray Crystallography. 366–368. <http://rb.gy/rx08dp>
- Illumina. (2020). Introduction to Next-Generation Sequencing (NGS). Illumina.com. Extraído de: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>
- IPCC. (2023). SYNTHESIS REPORT OF THE IPCC SIXTH ASSESSMENT REPORT (AR6). AR6 Synthesis Report: Climate Change 2023; IPCC. Extraído de: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/>
- Ravanat, R; Douki, T; & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 88–102. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00206-8](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00206-8)
- Jonkers, H; Thijssen, A; Muyzer, G; Copuroglu, O; & Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, 36(2), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>

- Kumar, J; Prabhakara, R; & Pushpa (2013). Bio Mineralisation of Calcium Carbonate by Different Bacterial Strains and Their Application in Concrete Crack Remediation. <https://shorturl.at/HKub7>
- Le Saout, G; Fuellmann, T; Kocaba, V; & Scrivener, K. (2007). Quantitative study of cementitious materials by X-ray diffraction/Rietveld analysis using an external standard. ResearchGate; ResearchGate. <http://rb.gy/gcjvaq>
- Li, C; Zhang, R; Meng, X; Chen, S; Zong, Y; Lu, C; Qiu, J; Chen, Y; Li, J; & Gao, C. (2020). Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. 38(7), 875–882. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0393-7>
- Mackay, A. (1988). D. McKie C. McKie. Essentials of Crystallography Oxford Blackwell Scientific Publications 1986. viii+435 pp. Price: cloth £25.00, limp £12.95. 52(367), 561–562. <https://doi.org/10.1180/minmag.1988.052.367.28>
- Meng, Z; Duan, R; Lv, D; Bu, G; Gao, Y; Zhang, P; Sun, Y; Guo, G; Qin, S; Sun, L; Zhang, D; Liang, J; Jing, H; & Wang, X. (2023). Rare case of bacteremia due to *Lysinibacillus sphaericus* in a person living with HIV. International Journal of Infectious Diseases, 135, 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.08.013>
- Morales, A. (2020). Identificación de la ruta metabólica para producción industrial de calcita por hidrólisis de urea en *Lysinibacillus sphaericus* mediante análisis computacional genético de *Sporosarcina*, *Bacillus* y *Lysinibacillus spp.* Trabajo de graduación en modalidad de tesis para optar al grado de Licenciado en Biotecnología Molecular, Universidad del Valle de Guatemala.
- Morales, A. (2021). Optimización de la producción de carbonato de calcio por tres cepas del género *Lysinibacillus*, aisladas del suelo de una cantera, para la formación de bioconcreto. Trabajo de graduación en modalidad de tesis para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.
- NASA. (2023). Climate Change Evidence: How Do We Know? Global Climate Change: Vital Signs of the Planet. Extraído de: <https://climate.nasa.gov/evidence/>
- National Environmental Methods Index. (s.f.). Total Hardness of Water by Titrimetry. Extraído de: [https://www.nemi.gov/methods/method\\\_summary/4684/](https://www.nemi.gov/methods/method\_summary/4684/)
- Oficemen. (2017). Historia del cemento. Agrupación de fabricantes de cemento de España. Extraído de: <https://www.oficemen.com/el-cemento/historia-del-cemento/>
- Onyeaka, H; & Ekwebelem, O. (2022). A review of recent advances in engineering bacteria for enhanced CO2 capture and utilization. International Journal of Environmental Science and Technology, 20(4), 4635–4648. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04303-8>
- Oreskes, N. (2004). The Scientific Consensus on Climate Change. Science, 306(5702), 1686–1686. <https://doi.org/10.1126/science.1103618>
- P, A. (2016). Selection of Different Types of Mutants. Biology Discussion. Extraído de: <https://www.biologydiscussion.com/bacteria/selection-of-different-types-of-mutants/51075>
- Pacheco, F; & Labrincha, J (2013). Biotech cementitious materials: Some aspects of an innovative approach for concrete with enhanced durability. Construction and Building Materials, 40, 1136–1141. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.09.080>
- Raghavendran, V; Asare, E; & Roy, I. (2020). Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. 89–138. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2020.07.002>

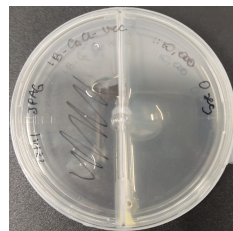
- Rojas, P; & Dussán, J. (2017). Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 33(10). <http://rb.gy/j1ckwi>
- Ruxton, G. (2006). The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. Behavioral Ecology, 17(4), 688–690. <https://doi.org/10.1093/beheco/ark016>
- Santer, B; Taylor, K; Wigley, T; Johns, T; Jones, P; Karoly, D; Mitchell, J; Oort, A; Penner, J; Ramaswamy, V; Schwarzkopf, M; Stouffer, R; & Tett, S. (1996). A search for human influences on the thermal structure of the atmosphere. Nature, 382(6586), 39–46. <https://doi.org/10.1038/382039a0>
- Scandiffio, P; Mantilla, T; Amaral, F; França, F; Basting, R; & Turssi, C. (2018). Anti-erosive effect of calcium carbonate suspensions. Journal of Clinical and Experimental Dentistry, 10(8), e776–e780. <https://doi.org/10.4317/jced.54994>
- Scrivener, K; John, V; & Gartner, E. (2018). Eco-efficient cements: Potential economically viable solutions for a low-CO2 cement-based materials industry. Cement and Concrete Research, 114, 2–26. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2018.03.015>
- Seifan, M; Samani, A; & Berenjian, A. (2016). Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(6), 2591–2602. <http://rb.gy/gp2ri5>
- Smit, B; Park, A; & Gadikota, G. (2014). The Grand Challenges in Carbon Capture, Utilization, and Storage. Frontiers in Energy Research, 2. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00055>
- Smyth, M; & Martin, J. (2000). X Ray crystallography. 53(1), 8–14. <https://doi.org/10.1136/mp.53.1.8>
- Snellings, R. (2018). X-ray powder diffraction applied to cement. <https://doi.org/10.1201/b19074-4>
- Cazzaniga, S; Dall'Osto, L; Szaub, J; Scibilia, L; Ballottari, M; Purton, S; & Bassi, R. (2014). Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0157-z>
- Stuckrath, C; Serpell, R; Valenzuela, L; & Lopez, M. (2014). Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: Performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures. Cement and Concrete Composites, 50, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2014.02.005>
- Teir, S; Auvinen, T; Said, A; Kotiranta, T; & Peltola, H. (2016). Performance of Separation Processes for Precipitated Calcium Carbonate Produced with an Innovative Method from Steelmaking Slag and Carbon Dioxide. Frontiers in Energy Research, 4. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00006>
- The Constructor: Building ideas. (2012). What are the Methods of Concrete Crack Repair? The Constructor. Extraído de: <https://theconstructor.org/concrete/methods-of-crack-repair/886/>
- Tillich, U; Lehmann, S; Schulze, K; Dühring, U; & Frohme, M. (2012). The Optimal Mutagen Dosage to Induce Point-Mutations in *Synechocystis* sp. PCC6803 and Its Application to Promote Temperature Tolerance. 7(11), e49467–e49467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049467>
- Torres, J; & Faulhaber, J. (2023). Triple-Valve Endocarditis due to *Lysinibacillus sphaericus* Infection. IDCases, 33, e01856–e01856. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2023.e01856>

- Trovão, M; Schüller, L; Machado, A; Bombo, G; Navalho, S; Barros, A; Pereira, H; Silva, J; Freitas, F; & Varela, J. (2022). Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. 20(7), 440–440. <https://doi.org/10.3390/md20070440>
- U.S. Global Change Research Program. (2023). Global Climate Change Impacts in the United States | GlobalChange.gov. GlobalChange.gov. Extraído de: <https://shorturl.at/yuEx0>
- UNEP. (2017). Mitigation: Climate Action. UNEP - UN Environment Programme. Extraído de: <https://www.unep.org/explore-topics/climate-action/what-we-do/mitigation>
- United Nations. (2020). What Is Climate Change? | United Nations. United Nations; United Nations. Extraído de: <https://www.un.org/en/climatechange/what-is-climate-change>
- Wang, T; Flint, S; & Palmer, J. (2019). Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. Biofouling. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1674811>
- Wang, J; Soens, H; Verstraete, W; & De Belie, N. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. Cement and Concrete Research, 56, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2013.11.009>
- Zheng, X; Xing, X; & Zhang, C. (2017). Targeted mutagenesis: A sniper-like diversity generator in microbial engineering. 2(2), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.07.001>
- Zhu, T; & Dittrich, M. (2016). Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00004>

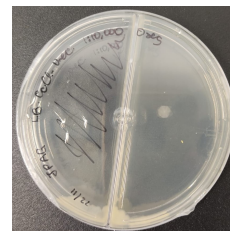
En este capítulo se muestran las figuras y cuadros complementarios necesarios para comprender mejor los resultados obtenidos. Estos son referenciados en el capítulo de análisis de resultados.

### 11.1. Figuras suplementarias

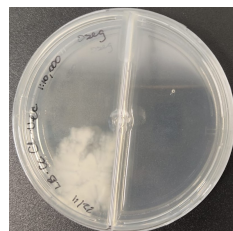
**Figura 13: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento control (1)**



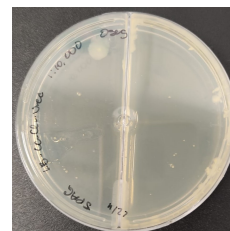
(a) Repetición 1 (a)



(b) Repetición 1 (b)



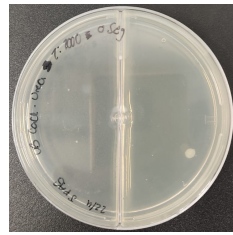
(c) Repetición 2



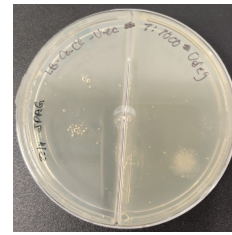
(d) Repetición 3

Se muestran cajas Petri con división. No se expusieron a radiación UV y se inocularon con una dilución 1:10000 del cultivo inicial. En las subfiguras (a) y (b) se observan solamente inoculados un lado de cada caja Petri, por lo que esto se consideró como una sola repetición.

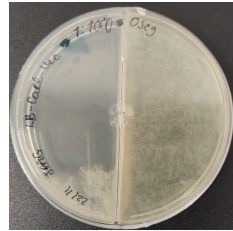
Figura 14: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento control (2)



(a) Repetición 1



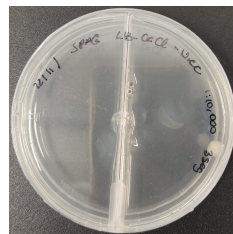
(b) Repetición 2



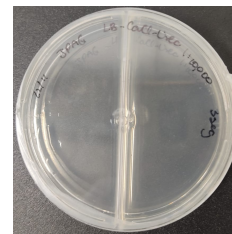
(c) Repetición 3

Se muestran cajas Petri con división. No se expusieron a radiación UV y se inocularon con una dilución 1:1000 del cultivo inicial.

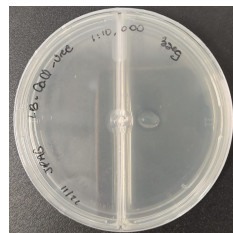
Figura 15: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (1)



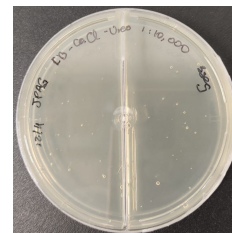
(a) Repetición 1



(b) Repetición 2

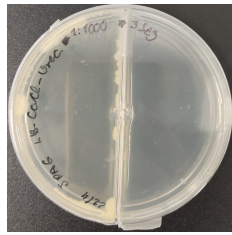


(c) Repetición 3

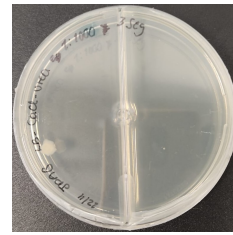


(d) Repetición 4

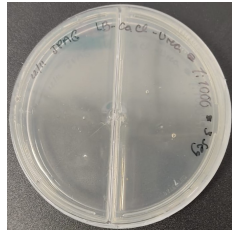
Se muestran cajas Petri con división. Se expusieron a radiación UV por 3 segundos y se inocularon con una dilución 1:10000 del cultivo inicial.

**Figura 16: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (2)**

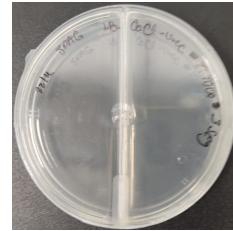
(a) Repetición 1



(b) Repetición 2

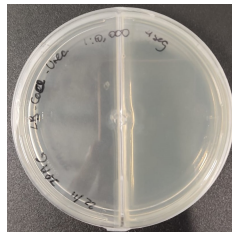


(c) Repetición 3

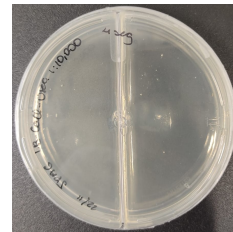


(d) Repetición 4

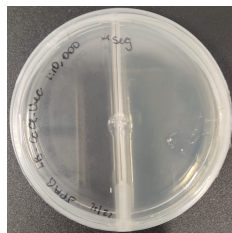
Se muestran cajas Petri con división. Se expusieron a radiación UV por 3 segundos y se inocularon con una dilución 1:1000 del cultivo inicial.

**Figura 17: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (3)**

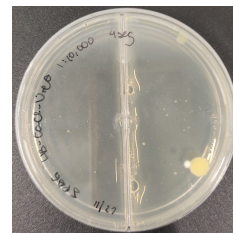
(a) Repetición 1



(b) Repetición 2

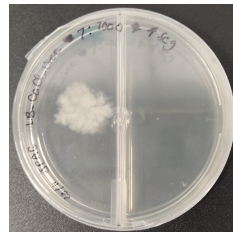


(c) Repetición 3

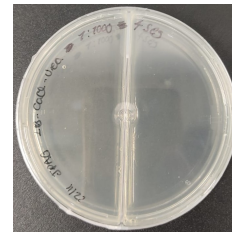


(d) Repetición 4

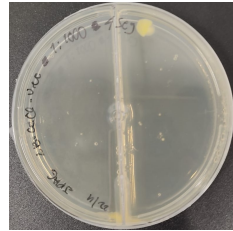
Se muestran cajas Petri con división. Se expusieron a radiación UV por 4 segundos y se inocularon con una dilución 1:10000 del cultivo inicial.

**Figura 18: Crecimiento de cepa P.5.3.A luego de tratamiento mutación (4)**

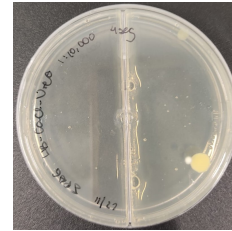
(a) Repetición 1



(b) Repetición 2

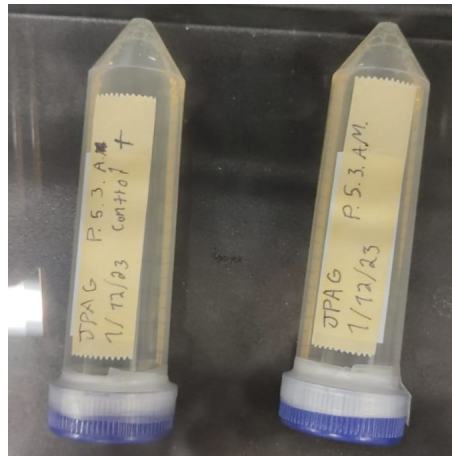


(c) Repetición 3

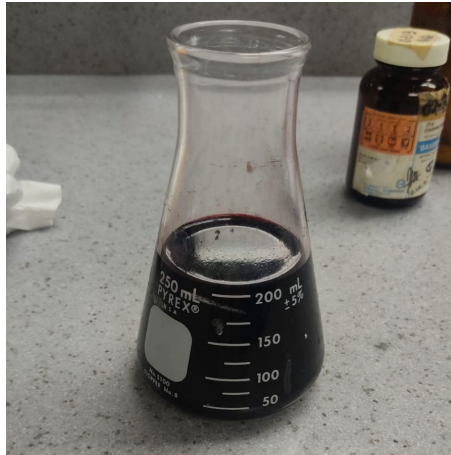


(d) Repetición 4

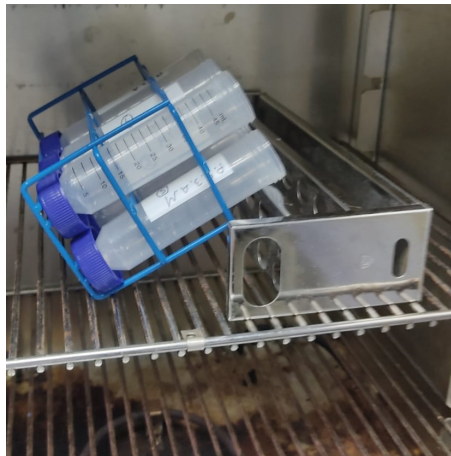
Se muestran cajas Petri con división. Se expusieron a radiación UV por 4 segundos y se inocularon con una dilución 1:1000 del cultivo inicial.

**Figura 19: Cultivo líquido de cepas sobrevivientes a tratamientos**

Se muestran los tubos descritos en la subsección 5.8.3 de "Crecimiento de cepas mutadas" en la Sección 5.8 de "Materiales y métodos".

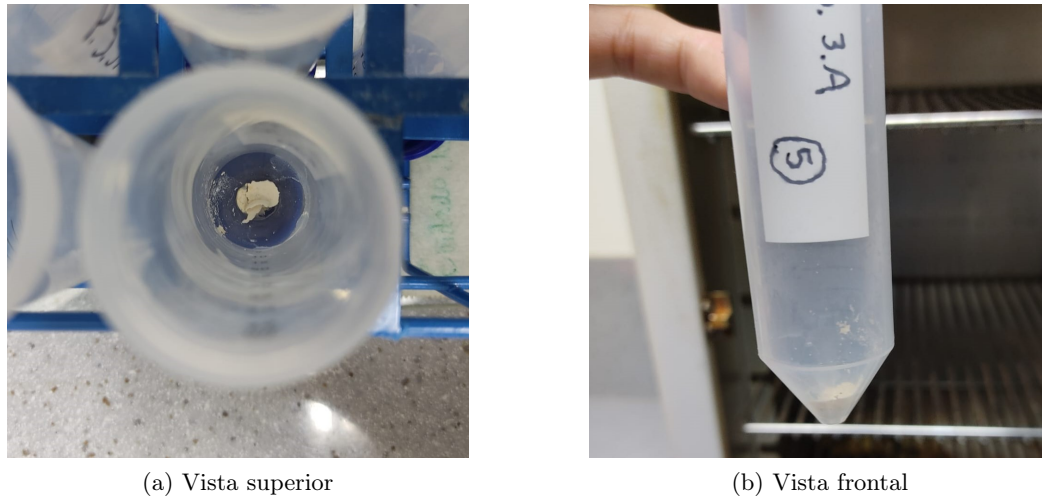
**Figura 20: Eriocromo negro T utilizado**

Se muestra el indicador Eriocromo Negro T utilizado en la subsección 5.8.3 de “Preparación de solución Eriocromo negro 0.5 %” en la Sección 5.8 de “Materiales y métodos”.

**Figura 21: Disposición de tubos dentro del horno**

Se muestran los tubos descritos en la subsección 5.8.4 de “Medición de peso seco” en la Sección 5.8 de “Materiales y métodos”.

Figura 22: Ejemplo de resultado del análisis gravimétrico en la muestra P.5.3.A (5)



(a) Vista superior

(b) Vista frontal

## 11.2. Cuadros suplementarios

Cuadro 6: Resultados de análisis gravimétrico

Muestra	Peso de $\text{CaCO}_3$ (gramos)
P.5.3.A.M (2)	0.1832
P.5.3.A. (3)	0.0852
P.5.3.A.M (3)	0.1725
P.5.3.A. (4)	0.0660
P.5.3.A.M (4)	0.0105
P.5.3.A. (5)	0.0716
P.5.3.A.M (5)	0.1901

Se presentan los datos obtenidos de carbonato de calcio por medio de gravimetría, utilizando el análisis de peso seco, para cada muestra.

Cuadro 7: Resultados de análisis de estequiometría

Muestra	Peso de $\text{CaCO}_3$ (gramos)
P.5.3.A.M (2)	0.0805
P.5.3.A. (3)	0.0375
P.5.3.A.M (3)	0.0759
P.5.3.A. (4)	0.0290
P.5.3.A.M (4)	0.0046
P.5.3.A. (5)	0.0315
P.5.3.A.M (5)	0.0836

Se presentan datos obtenidos del secuestro de dióxido de carbono por medio de la precipitación de carbonato de calcio, utilizando un análisis estequiométrico de la reacción metabólica de *L. sphaericus*, para cada muestra.

Cuadro 8: Resultados de prueba Dixon para datos atípicos

Valor p	Conclusión
0.5054	No hay valor atípico

Se presenta la cuantificación del secuestro de dióxido de carbono por medio de la precipitación de carbonato de calcio por medio de un análisis estequiométrico de la reacción metabólica de *L. sphaericus*.

### 11.3. Script utilizado para el análisis estadístico en RStudio

Script utilizado para el análisis estadístico de la producción de carbonato de calcio y secuestro de dióxido de carbono de las cepas P.5.3.A y P.5.3.A.M:

```
#Tesis.
#José Aguilar
#Paso 1: Base de datos en formato tidy, cargar librerías, importar la base y verificar el tipo de
variables
library(readxl)
library(ggplot2)
library(tidyverse)
library(ggpubr)
library(rstatix)
library(dixonTest)
CACO3 = read_excel("/Users/Jose/Documents/Tesis/Producción de CaCO3 datos.xlsx")
View(CACO3)
str(CACO3)
#Cambio de variables y nombres
CACO3$CEPA = as.character(CACO3$Cepa)
CACO3$MUTA = as.factor(CACO3$Mutación)
CACO3$TIEMPO = as.factor(CACO3$Tiempo)
CACO3$CaCO3 = as.numeric(CACO3$'Gramos CaCO3')
CACO3$CO2 = as.numeric(CACO3$'Gramos CO2')
str(CACO3)
##Estadística descriptiva #Producción de CaCO3 y Secuestro de CO2
by(CACO3, CACO3$MUTA, summary)
##Comprobar datos atípicos dixonTest(CACO3$CaCO3)
##Producción de CaCO3
```

```
#Gráfico de producción de carbonato de calcio en función de la mutación
plot(CaCO3 MUTA, data=CACO3, xlab = "Mutación efectuada", ylab = "Producción de Ca-
CO3")

#Prueba t
t.test(CaCO3 MUTA, data = CACO3)

###Secuestro de CO2

#Gráfico de secuestro de dióxido de carbono en función de la mutación
plot(CO2 MUTA, data=CACO3, xlab = "Mutación efectuada", ylab = "CO2 secuestrado")

#Prueba t
t.test(CO2 MUTA, data = CACO3)

#Citas de los paquetes utilizados
citation(readxl")
citation("ggplot2")
citation("tidyverse")
citation("ggpubr")
citation(rstatix")
citation("dixonTest")
```