
Mutagénesis aleatoria mediante el uso de radiación UV en bacterias diazotróficas para establecer una mejora en la capacidad fijadora de nitrógeno

Diana Rocio Aguilar Rodríguez



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Mutagénesis aleatoria mediante el uso de radiación UV en
bacterias diazotróficas para establecer una mejora en la
capacidad fijadora de nitrógeno**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Diana Rocio Aguilar Rodríguez
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala,
2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Mutagénesis aleatoria mediante el uso de radiación UV en
bacterias diazotróficas para establecer una mejora en la
capacidad fijadora de nitrógeno**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Diana Rocio Aguilar Rodríguez
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología


Guatemala,
2024

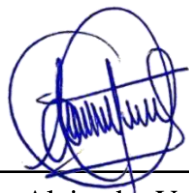
Vo.Bo.:

(f) 
PhD.C Isabella García Caffaro

Tribunal Examinador:

(f) 
PhD.C Isabella García Caffaro

(f) 
Ph.D.Dalia Lau Bonilla

(f) 
M.Sc Mayra Alejandra Valey Turcios

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre de 2024.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas e instituciones involucradas en la realización de este trabajo de graduación, principalmente:

A mi asesora, PhD.C Isabella García Caffaro, por su dedicación, consejos, y orientación durante todo este proceso. Su experiencia y conocimientos fueron fundamentales para mi crecimiento profesional y personal.

A mi segunda asesora, Ph.D.Dalia Lau Bonilla, por su orientación, conocimientos, y mentoría que fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Al Ingencio Magdalena y al Centro de Estudios en Biotecnología, por su generosa contribución, proporcionando herramientas y equipo para lograr el desarrollo de esta investigación.

A mis padres, Ruth Rodríguez y Vladimir Aguilar, por motivarme y apoyarme en cada paso de este camino, por ser los mejores ejemplos de esfuerzo, perseverancia y amor.

A mis queridos compañeros y amigos de la carrera, por todo su apoyo a lo largo de esta investigación.

Agradecimientos	III
Lista de figuras	vII
Lista de cuadros	vIII
Resumen	IX
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Justificación	4
4. Antecedentes	6
5. Marco teórico	8
5.1. Caña de azúcar (<i>Saccharum spp.</i>).....	8
5.2. Fertilizantes nitrogenados	9
5.3. Biofertilizantes	9
5.4. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	10
5.4.1. Fijación biológica de nitrógeno	11
5.5. Mejoramiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal	11
5.5.1. Mutaciones	12
5.5.2. Mutaciones aleatorias	12
5.5.3. Aplicaciones de la mutagénesis aleatoria	12
5.5.4. Agentes mutagénicos	13
5.5.5. Radiación Ultra Violeta -UV	13
5.6. Método espectrofotométrico.....	14
6. Metodología	15
6.1. Sitio de estudio.....	15
6.2. Diseño, enfoque y tipo de investigación	15
6.3. Tipo y tamaño de muestra	15

6.4.	Hipótesis	15
6.4.1.	Hipótesis de investigación	15
6.4.2.	Hipótesis nula.....	16
6.5.	Variables.....	16
6.6.	Metodología.....	16
6.6.1.	Reaislamiento y purificación de las cepas seleccionadas	16
6.6.2.	Método espectrofotométrico para la estimación de la fijación de nitrógeno de bacterias diazótroficas	16
6.6.3.	Mutagénesis aleatoria mediante el uso de radiación Ultra Violeta	17
6.6.4.	Análisis estadístico	17
6.6.5.	Elaboración de un cepario de las bacterias diazotróficas mutadas con una alta capacidad de fijar nitrógeno.....	17
7.	Resultados	19
7.1.	Uso y validación de la curva estándar.....	19
7.2.	Curvas de crecimiento bacteriano.....	22
8.	Discusión	31
9.	Conclusiones	35
10.	Recomendaciones	36
11.	Bibliografía	37
12.	Anexos	45
12.1.	Protocolos	46
12.2.	Cuadros.....	57
12.3.	Código	60

Lista de figuras

5.1. Mecanismo de acción de las PGPR, 1. Mecanismo directo, 2. Mecanismos indirectos [75]	10
5.2. Mecanismo de acción de la radiación Ultra Violeta. A: Fotoproducto : dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs). B: Fotoproducto de 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPs) [40]	14
6.1. Diagrama de flujo de la metodología resumida.....	18
7.1. Curva estándar de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo NFb versus absorbancia. La línea de regresión es representada por la ecuación $y=0.0007x-0.004$, donde y corresponde a la absorbancia y x corresponde a la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo	19
7.2. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada mediante el método espectrofotométrico, previo a la irradiación con UV. Código de las cepas: <i>Pseudomonas baetica</i> (1AB27), <i>Bacillus paramycoides</i> (1BP10), <i>Bacillus cereus</i> (2AP10), <i>Bacillus subtilis</i> (2MO12), <i>Burkholderia cepacia</i> (2MO14), y <i>Bacillus cereus</i> (4AP9)	22
7.3. Curvas de crecimiento bacteriano en caldo Luria-Bertani (LB). Curva de crecimiento para <i>Pseudomonas baetica</i> , se observa un crecimiento constante alcanzando un OD600 cercano a 0.2 (a). Curva de crecimiento para <i>Bacillus paramycoides</i> , patrón de crecimiento constante, ligeramente más lento a comparación de la curva a (b). Curva de crecimiento para <i>Bacillus cereus</i> (c). Curva de crecimiento para <i>Bacillus subtilis</i> , se observa una tasa de crecimiento más lenta, alcanzado un valor OD600 menor a 0.2(d). Patrón de crecimiento similar(c y f). Curva de crecimiento para <i>Burkholderia cepacia</i> , inicio de fase de crecimiento exponencial más rápida a comparación de las demás curvas de crecimiento (e). Curva de crecimiento para <i>Bacillus cereus</i> (f)	23
7.4. Curvas de crecimiento bacteriano en caldo NFb. Curva de crecimiento para <i>Pseudomonas baetica</i> , patrón de crecimiento gradual (a). Curva de crecimiento para <i>Bacillus paramycoides</i> (b), curva de crecimiento constante, menos pronunciada a comparación con <i>Pseudomonas baetica</i> . Curva de crecimiento para <i>Bacillus cereus</i> (c). Cuentan con un patrón de crecimiento gradual alcanzando un OD600 cercano a 0.2 (c y f). Curva de crecimiento para <i>Bacillus subtilis</i> (d). Curva de crecimiento para <i>Burkholderia cepacia</i> , se observa un patrón de crecimiento más lineal (e). Curva de crecimiento para <i>Bacillus cereus</i> (f)	24
7.5. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada previo y luego de la irradiación con UV. *: corresponde a un valor $p < 0.05$, por lo que existe diferencia significativa entre la concentración fijada previo y post a la irradiación. Concentración de nitrógeno fijada por <i>Pseudomonas baetica</i> (a). Concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus paramycoides</i> (b). Mediciones realizadas en triplicado y con una dosis de radiación de 3 segundos	25

7.6. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada previo y luego de la irradiación con UV. *: corresponde a un valor $p < 0.05$, por lo que existe diferencia significativa entre la concentración fijada previo y post a la irradiación. Concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus subtilis</i> (a). Concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus cereus</i> (b). Mediciones realizadas en triplicado y con una dosis de radiación de 3 segundos	26
7.7. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus cereus</i> previo y luego de la irradiación con UV. *: corresponde a un valor $p < 0.05$, por lo que existe diferencia significativa entre la concentración fijada previo y post a la irradiación. Mediciones realizadas en triplicado.	27
7.8. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por <i>Pseudomonas baetica</i> previo y luego de la irradiación con UV	28
7.9. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus paramycoides</i> previo y luego de la irradiación con UV.....	28
7.10. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus subtilis</i> previo y luego de la irradiación con UV.....	29
7.11. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus cereus</i> previo y luego de la irradiación con UV.....	29
7.12. Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por <i>Bacillus cereus</i> previo y luego de la irradiación con UV.....	30
12.1. SOP 20 - Página 1	46
12.2. SOP 20 - Página 2.....	47
12.3. SOP 20 - Página 3.....	48
12.4. SOP 20 - Página 4.....	49
12.5. SOP 21 - Página 1	50
12.6. SOP 21 - Página 2.....	51
12.7. SOP 21 - Página 3.....	52
12.8. SOP 21 - Página 4.....	53
12.9. SOP 22 - Página 1	54
12.10. SOP 22 - Página 2.....	55
12.11. SOP 22 - Página 3.....	56

Lista de cuadros

5.1. Guatemala: valor (fob) de los 5 principales productos de expo tación, a mayo de 2022 [42] .	9
6.1. Definición de variable	16
7.1. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para los datos de fijación de nitrógeno por las distintas cepas bacterianas1	20
7.2. Test de Normalidad de Shapiro-Wilk	20
7.3. Test de Homogeneidad de Varianzas de Levene	20
7.4. Resultados del test de Tukey 2	21
12.1. Concentración de nitrógeno obtenida para la curva estándar, y sus datos de absorbancia	57
12.2. Datos de absorbancia y resultados por cepa para la cuantificación de nitrógeno fijado	57
12.3. Concentraciones de nitrógeno fijadas por las bacterias diazotróficas	57
12.4. Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 2AP10	58
12.5. Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 1BP10	58
12.6. Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 2MO12	59
12.7. Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 4AP9	59
12.8. Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 1AB27	60

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo relevante para Guatemala, debido a su aporte en la economía e industria agrícola. Para obtener un buen crecimiento y rendimiento en los cultivos, es necesario la aplicación de fertilizantes nitrogenados. A pesar que, el fertilizante químico es importante para mantener el rendimiento y calidad de los cultivos, el uso excesivo de este tiene un efecto dañino en el medio ambiente y salud humana. Como una solución al uso excesivo de fertilizantes nitrogenados se ha planteado el uso de bacterias diazotróficas; las cuales pueden transformar el nitrógeno atmosférico a una forma más disponible y soluble para las plantas. El presente estudio tenía como propósito determinar si el uso de radiación UV, con el objetivo de generar una mutagénesis aleatoria, mejoraría la capacidad fijadora de nitrógeno en diferentes cepas bacterianas de suelo. Además, se buscó cuantificar el nitrógeno fijado por bacterias diazotróficas, empleando un método espectrofotométrico. Se utilizó un medio libre de nitrógeno para seleccionar las bacterias con una capacidad de fijar nitrógeno. Tras realizar la mutagénesis aleatoria se estableció una mejora en la capacidad fijadora de nitrógeno todas las mutantes generadas para *Pseudomonas baetica*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus cereus*. De las colonias individuales, la colonia 22 de *Pseudomonas baetica*, mostró la mayor diferencia entre las capacidades de fijación de nitrógeno de la colonia mutada y la colonia control. Para futuros análisis, se recomienda realizar una secuenciación de los genes *nif* de las colonias mutadas con una mejora en su capacidad de fijar nitrógeno, para establecer los efectos de las mutaciones inducidas por la radiación UV.

Abstract

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a highly significant crop for Guatemala due to its contribution to the economy and agricultural industry. To achieve optimal growth and yield, the application of nitrogen-based fertilizers is necessary. Although chemical fertilizers are essential for maintaining crop yield and quality, their excessive use has detrimental effects on the environment and human health. As a solution to the overuse of nitrogen fertilizers, the application of diazotrophic bacteria has been proposed. These bacteria can transform atmospheric nitrogen into a more available and soluble form for plants. The purpose of this study was to determine whether the use of UV radiation to induce random mutagenesis could improve the nitrogen-fixing ability of different soil bacterial strains. Additionally, nitrogen fixation by diazotrophic bacteria was quantified using a spectrophotometric method. A nitrogen-free medium was employed to select bacteria capable of fixing nitrogen. Following random mutagenesis, an improvement in nitrogen-fixing capacity was observed in all mutant strains of *Pseudomonas baetica*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus cereus*. Among individual colonies, colony 22 of *Pseudomonas baetica* showed the greatest difference in nitrogen-fixing capacity compared to the control colony. For future analyses, it is recommended to perform sequencing of the *nif* genes in the mutant colonies that exhibited improved nitrogen-fixing capacity to identify the effects of UV-induced mutations.

La caña de azúcar es un cultivo clave como fuente de bioenergía y de alimentos, el cual es considerado un componente esencial en la economía de múltiples países en las regiones tropicales y subtropicales [78]. Específicamente su producción comercial se basa en la extracción de sacarosa, representando más del 75 % del azúcar producido a nivel mundial [36]. Para obtener un buen rendimiento, calidad y crecimiento del cultivo, se utilizan fertilizantes nitrogenados, los cuales mejoran parámetros agronómicos, la calidad del jugo y el rendimiento de azúcar [110]. Sin embargo, una aplicación excesiva con nitrógeno a largo plazo no solo incrementa los costos y reduce la eficiencia en su uso, sino que también genera impactos ambientales negativos significativos, como mayores pérdidas de nitrógeno en los campos agrícolas [29]. Se estima que solo entre el 30 % y el 50 % del fertilizante nitrogenado aplicado es absorbido por los cultivos para mantener su crecimiento normal [72]. El nitrógeno que no es absorbido ni inmovilizado en las reservas de materia orgánica del suelo, se encuentra expuesto a pérdidas mediante la emisión de óxido nitroso, la volatilización de amoníaco y la lixiviación [107, 102, 19].

El sistema de una aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados no es sostenible, debido a la reducción en su eficiencia y las altas pérdidas al ambiente, por lo que es necesario desarrollar estrategias alternativas que permitan incrementar la productividad agrícola de manera sostenible. En este contexto, es fundamental que los cultivos adquieran mayor resistencia frente a condiciones de estrés, como sequías o salinidad, así como una mayor tolerancia a patógenos. Una estrategia para lograr estas características deseables es el uso de microorganismos del suelo, específicamente las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) [100]. Las PGPR generan efectos beneficiosos en el proceso de desarrollo de distintas especies vegetales, por lo que pueden emplearse para mejorar la salud de las plantas y acelerar su tasa de crecimiento, sin generar contaminación ambiental [6]. Una de las funciones más importantes de las PGPR es la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, proceso en el que algunas bacterias, como las del género *Azotobacter*, *Rhizobium* y *Bacillus*, convierten el nitrógeno gaseoso en formas utilizables por las plantas, como el amonio [69]. Este proceso es llevado a cabo por enzimas como la nitrogenasa, que permite la reducción del nitrógeno a compuestos orgánicos que las plantas pueden asimilar, contribuyendo a la nutrición de las plantas [16]. En los diazótrofos, se han identificado tres tipos distintos de nitrogenasa, en este caso la nitrogenasa con molibdeno, la nitrogenasa con vanadio y la nitrogenasa con hierro [68]. La incorporación de las PGPR como biofertilizantes fomenta el crecimiento de las plantas de manera directa o indirecta, a través de la solubilización de nutrientes del suelo, la producción de hormonas estimulantes del crecimiento vegetal y producción de sideróforos [9]. La implementación de estas bacterias como biofertilizantes mejoraría la eficiencia en el uso de nutrientes y una reducción del impacto ambiental asociado con la aplicación excesiva de fertilizantes químicos en los suelos.

A pesar de los numerosos beneficios que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal ofrecen en el rendimiento y desarrollo de los cultivos, se han implementado herramientas de ingeniería genética para optimizar y fortalecer sus capacidades. Por ejemplo, se han introducido genes que codifican proteínas capaces de potenciar las funciones beneficiosas de las PGPB y se ha aplicado la técnica de mutagénesis aleatoria para mejorar procesos específicos y para la producción de biomoléculas [59, 47]. Dado a que existen múltiples complejos de nitrogenasa, la mutagénesis aleatoria representa una estrategia útil para generar mutantes más eficientes en la fijación de nitrógeno, incluso sin conocer la secuencia de los genes y promotores involucrados en este proceso. Por lo tanto, se destaca la necesidad de realizar estudios enfocados en la identificación y modificación de genes que tengan la capacidad de incrementar el rendimiento y crecimiento en plantas, sin afectar el medio ambiente.

2.1. Objetivo general

Realizar una mutagénesis aleatoria con radiación UV a 425nm de cepas con capacidad de fijar nitrógeno.

2.2. Objetivos específicos

- Cuantificar el nitrógeno fijado por bacterias diazotróficas, empleando un método espectrofotométrico.
- Elaborar curvas de crecimiento bacteriano previo al proceso de mutagénesis aleatoria.
- Generar mutantes de las bacterias diazotróficas por medio de la exposición a radiación UV a 425nm.
- Evaluar la mejora de la capacidad fijadora de nitrógeno en las bacterias diazotróficas
- Elaborar un cepario con los mutantes de bacterias diazotróficas generados, que logren mejorar la capacidad fijadora de nitrógeno, luego del proceso de mutagénesis aleatoria.

Guatemala es el país de la región de Centroamérica con mayor rendimiento de producción de azúcar por hectárea de caña cultivada (82.7 toneladas al año)[87]. En el 2021 la exportación de azúcar representó el 5 % de las exportaciones totales del país, siendo considerado el segundo producto agroindustrial con mayor tasa de exportación. De esta manera, el azúcar, el maíz y el banano generan una contribución superior al 15 % del PIB agrícola del país [97]. Este alto rendimiento de producción de azúcar se encuentra vinculado con el uso de agroquímicos, los cuales son necesarios para el crecimiento y una buena calidad de los cultivos. El mercado de producción y distribución de agroquímicos en Guatemala, se encuentra alrededor de 250 millones de dólares anuales [87]. Gran parte de los fertilizantes utilizados en Centroamérica son importados, lo que hace que su precio esté significativamente influenciado por el mercado internacional [23].

El valor de las importancias de fertilizantes químicos ha aumentado debido a una serie de crisis recientes, como el conflicto entre Rusia y Ucrania y la falta de transporte y logística para la importación de insumos por la pandemia de COVID-19. En América Latina y el Caribe se observó una tendencia de incremento de las importaciones de fertilizantes químicos durante los primeros seis meses de 2022, que causó en promedio un incremento del 136.6 % a comparación del año anterior [23]. Asimismo, en Guatemala el precio promedio nacional del quintal de urea incrementó un 82.10 % en 2 años [26] [97]. La variabilidad de los precios de fertilizantes químicos afecta la producción agrícola y la seguridad alimentaria, ya que el alza de precios obliga a los productores a disminuir la aplicación de fertilizantes químicos disminuyendo así el rendimiento y la calidad de los alimentos [3]. A pesar que, el fertilizante químico es importante para mantener el rendimiento y calidad de los cultivos, el uso excesivo de este tiene un efecto dañino en el medio ambiente y salud humana. En los humanos puede causar metahemoglobinemia, diabetes, cáncer colorrectal, enfermedad de la tiroides y defectos del tubo neural [46].

Como una solución al uso excesivo de fertilizantes nitrogenados se ha planteado el uso de bacterias diazotroficas. Estas bacterias pueden transformar el nitrógeno atmosférico a una forma más accesible y soluble para las plantas [94]. La aplicación de estas bacterias como suplemento puede generar un beneficio para el medio ambiente, salud humana y un beneficio económico para los agricultores [6]. Aunque estas bacterias se han convertido en una alternativa para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados, es relevante destacar que se pueden realizar modificaciones genéticas en ellas para aumentar sus capacidades en la mejora de la fertilidad del suelo, la salud y el crecimiento de las plantas [96]. Una manera de lograr estas modificaciones es mediante mutaciones, utilizando la radiación UV como agente mutagénico para generar una diversidad de mutaciones y variantes útiles de manera más rápida [93]. Recientemente se ha demostrado que el uso de esta tecnología ha llegado a mejorar diversos procesos, por ejemplo Macdonald y colaboradores [60] emplearon radiación UV como mutágeno para incrementar el contenido de fucoxantina en *Phaeodactylum tricornutum*. Además,

Kanakdande y colaboradores [47] utilizaron radiación UV a 254nm y a 365nm para incrementar el contenido de lípidos celulares en *Bacillus amyloliquefaciens*. El presente estudio tiene como propósito determinar si el uso de radiación UV, con el objetivo de generar una mutagénesis aleatoria, mejoraría la capacidad fijadora de nitrógeno en diferentes cepas bacterianas de suelo.

Debido a la necesidad de desarrollar alternativas para reducir el uso de fertilizantes nitrogenadas, el presente trabajo es parte de un proyecto de investigación conformado por el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) y el Ingenio Magdalena.

En 1981, Kloepper y Schroth definieron a las cepas bacterianas beneficiosas para las especies vegetales como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Las PGPR son bacterias aisladas de la rizosfera, endosfera y filosfera de diversas especies de plantas [81]. Tienen la habilidad de colonizar las raíces de las plantas y, de esta manera, generar beneficios a sus hospederos. Estos beneficios se obtienen a través de mecanismos directos, como la producción de fitohormonas y aumento en disponibilidad de nutrientes, y mediante mecanismos indirectos, como la resistencia contra patógenos. Algunos de los microorganismos utilizados para aumentar la productividad agrícola incluyen: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Serratia* y *Streptomyces* [57]. Un ejemplo de la aplicación de las PGPR para el mejoramiento del rendimiento de los cultivos es la investigación realizada por Rosa y colaboradores [83], quienes evaluaron el efecto de la inoculación de tres especies de PGPR junto con diferentes dosis de fósforo en el cultivo de caña de azúcar. En donde se observó un mejoramiento en la acumulación de nutrientes, la materia seca y el rendimiento del cultivo. Además, Muthukumarasamy y colaboradores [69] establecieron que la asociación entre bacterias diazotróficas solubilizadoras de fósforo y potasio causó el aumento de la clorofila foliar, el contenido de nitrógeno y la biomasa total.

Uno de los mecanismos por los cuales las PGPR benefician a las plantas es mediante la fijación biológica de nitrógeno, un proceso donde convierten el nitrógeno gaseoso en formas utilizables para las plantas. En el estudio realizado por Huang y colaboradores [44], se evaluó el efecto de tres cepas de PGPR sobre el crecimiento de plántulas de *Pyrus betulifolia* bajo condiciones limitadas de nitrógeno y el cambio en la composición de las comunidades bacterianas del suelo. Se observó un mejoramiento en el crecimiento de las plántulas, un aumento en la abundancia de bacterias asociadas con la fijación del nitrógeno y un incremento en la abundancia relativa de nitrogenasa en los tratamientos evaluados. Ke y colaboradores [50] reportaron los efectos de una inoculación con *Pseudomonas stutzeri* A1501 en la adquisición de nitrógeno y sobre la comunidad bacteriana en la rizósfera del maíz. Los resultados destacaron un incremento significativo en la población de bacterias fijadoras de nitrógeno y oxidantes de amonio, en la transcripción de genes funcionales relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno, y un mejoramiento en el crecimiento del maíz en condiciones de invernadero. Esta evidencia resalta el potencial de *P. stutzeri* para disminuir el uso de fertilizantes sintéticos utilizados en los cultivos de maíz.

Se ha estudiado el impacto de cuatro cepas de PGPR, específicamente *Klebsiella* sp. Br1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus pumilus* S1r1 y *Acinetobacter* sp. S3r2, en la fijación biológica de nitrógeno y remobilización de nitrógeno en maíz. Este estudio fue realizado con una reducción del fertilizante nitrogenado (a un tercio de la dosis recomendada), y se demostró que con la inoculación con *B. pumilus* se realizó el

proceso de la fijación biológica de nitrógeno, se retrasó la remobilización de nitrógeno en maíz, y aumentó el rendimiento de mazorcas hasta un 30.9 % con una menor aplicación de fertilizantes nitrogenados [51]. Lin y colaboradores [55] han estudiado el efecto de inoculantes con PGPR en la biomasa y en la cantidad de nitrógeno en maíz utilizando cinco niveles de fertilizante nitrogenado (0-100 % de la dosis recomendada). Se observó que al utilizar los tratamientos con PGPR mejoró significativamente el crecimiento del maíz en la etapa de crecimiento vegetativo V6. Además, al utilizarlo en conjunto con una dosis reducida al 50 % de fertilizante nitrogenado se produjo biomasa y concentraciones de nitrógeno iguales o superiores a las alcanzadas con la aplicación del 100 % del fertilizante sin inoculantes. Estos resultados sugieren que al utilizar las PGPR se podría reducir la fertilización inorgánica sin afectar el crecimiento de este cultivo.

En otro estudio se evaluó cómo las cepas diazotróficas *Pseudomonas koreensis* CY4 y *P. entomophila* CN11 ayudaron en el defensa vegetal, en el proceso de fijación de nitrógeno y en el crecimiento del cultivo de caña de azúcar. Se determinó la capacidad de estas cepas de realizar el proceso de fijación de nitrógeno y los resultados indicaron que entre 21 % y el 35 % del nitrógeno de la planta es fijado biológicamente por estas bacterias. Las inoculaciones con ambas cepas aumentaron significativamente la actividad enzimática, la producción de fitohormonas, la expresión de genes relacionados con el estrés y protección vegetal [92]. Estos hallazgos destacan la importancia de las PGPR en la mejora de la eficiencia del uso del nitrógeno y sugieren su potencial para reducir la dependencia de fertilizantes químicos en la agricultura sostenible.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal han demostrado su utilidad para aumentar la productividad y eficiencia de los cultivos; no obstante, se ha intentado aumentar sus capacidades empleando irradiación UV como mutágeno. Shahid y colaboradores [90] y Watanabe y colaboradores [103] han realizado mutagénesis con radiación UV en cepas de *Bacillus* sp y *Pichia stipitis*, las cuales presentaron un mejoramiento en sus capacidades de solubilizar nutrientes y producción de etanol. Otra manera de maximizar sus capacidades es mediante la transferencia de rasgos promotores del crecimiento vegetal hacia aislados de rizobacterias o comunidades bacterianas en la rizósfera, generando PGPR mejoradas para su aplicación en la industria agrícola. La transferencia de estos rasgos se ha enfocado en el proceso de fijación de nitrógeno, y uno de los avances más significativos fue realizado en 1972 al transferir el clúster *nif* de *Klebsiella oxytoca* M5a1 a *Escherichia coli* [34]. Uno de los principales retos de generar cepas que fijen nitrógeno es resolver la regulación natural de la fijación de nitrógeno dependiente de amonio. Un estudio demostró que, aunque *Pseudomonas stutzeri* A1505 no fije nitrógeno en presencia de amonio, la transferencia de los genes *nif* a *P. protegens* Pf-5 permitió que esta cepa adquiriera la capacidad de fijar nitrógeno sin ser inhibida por el amonio. Al modificar genéticamente la cepa *P. protegens* Pf-5, esta logró liberar nitrógeno al entorno y promover el crecimiento de *Arabidopsis*, alfalfa, festuca, trigo y maíz en condiciones con baja disponibilidad de nitrógeno [89].

5.1. Caña de azúcar (*Saccharum spp.*)

La caña de azúcar se encuentra clasificada en la familia de las gramíneas, y al género *Saccharum*. Existen al menos seis especies de este género, en donde la caña de azúcar es un híbrido multiespecie denominada *Saccharum spp* [98]. Las temperaturas óptimas para su desarrollo son: 32-38°C para el proceso de germinación, 32°C para el proceso de macollamiento (proceso fisiológico donde se obtiene de una misma planta varios tallos) y 27°C para el crecimiento [37]. La etapa fisiológica que proporciona un rendimiento económico es el proceso de maduración, la cual es una etapa caracterizada entre el crecimiento rápido y la muerte final de la planta. Es posible estimar la etapa ideal de maduración para generar el mayor rendimiento industrial, tomando en consideración parámetros como la medición del contenido de polarización (porcentaje de sacarosa) en la caña de azúcar, brix (contenido de sólidos solubles), la pureza y los azúcares reductores [38]. Para su desarrollo, requiere de diversos nutrientes, los cuales son carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno y cloro [65]. Es un cultivo ampliamente cultivado debido a su capacidad de sintetizar y almacenar concentraciones significantes de sacarosa en su tallo [4]. Además del producto de sacarosa, se generan derivados como el etanol y subproductos como melaza (materia prima para la producción de alcohol) y el bagazo [11]. A nivel mundial, esta planta tropical contribuye al 70 % de la producción de azúcar, y en el 2018 superó las 1,907,024,730 toneladas de producción. Los mayores productores de caña de azúcar con Brasil y la India [31].

La caña de azúcar (*Saccharum spp.*) es un cultivo bastante relevante para Guatemala, debido a su aporte en la economía e industria agrícola. Esta relevancia se observa en el cuadro 1, al ocupar el cuarto lugar de las exportaciones en mayo de 2022, con US\$443, 575.5 [42]. Además, representa el 3.0 % del PIB y ha generado en promedio el 1.11 % del PIB nacional en los últimos 9 años, en el periodo de 2007-2016[95]. La caña de azúcar también representa un 19.4 % del valor de la producción agrícola y un 23 % del total de las divisas de productos tradicionales [31]. Guatemala se encuentra como el quinto país exportador de este producto a nivel mundial, en segundo lugar para la región de Latinoamérica y en tercer lugar en parámetro de productividad a nivel mundial [15].

No.	Productos	Monto (en miles de US\$)	% participación	GRÁFICO EN %
	Total exportaciones	6,770,650.6	% 39.7	
1	Artículos de vestuario	772,902.1	11.4 %	
2	Café	618,164.8	9.1 %	
3	Grasas y aceites comestibles	454,654.5	6.7 %	
4	Azúcar	443,575.5	6.6 %	
5	Banano	400,217.8	5.9 %	

Tabla 5.1: Guatemala: valor (fob) de los 5 principales productos de expo tación, a mayo de 2022 [42]

5.2. Fertilizantes nitrogenados

Para obtener un buen crecimiento y rendimiento en los cultivos, es necesario la aplicación de fertilizantes nitrogenados.

La urea es el fertilizante nitrogenado más utilizado, ya que contienen el mayor contenido de nitrógeno entre todos los fertilizantes nitrogenados sólidos (46 %)[14]. Sin embargo, solamente el 30-50 % de este fertilizante es absorbido y utilizado por el cultivo de la caña de azúcar. Se ha observado un uso excesivo de este fertilizante, lo cual puede provocar una reducción en la eficiencia del uso del nitrógeno, y el exceso puede llegar a desembocar en ríos u otras fuentes de agua potable, generando contaminación en el medio ambiente y generando la acidificación de suelos, un desbalance de nutrientes, un efecto negativo en el ciclo del carbono del suelo [45]. De la misma manera que un uso excesivo de fertilizantes nitrogenados causa efectos negativos, una aplicación insuficiente provoca un crecimiento deficiente en la caña de azúcar, dando como resultado hojas estrechas, tallos delgados y entrenudos cortos [44].

5.3. Biofertilizantes

Debido al uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y los efectos negativos que estos pueden llegar a generar, se ha explorado la idea de utilizar biofertilizantes en el sistema de cultivos. Los biofertilizantes tienen la característica de contener microorganismos vivos o latentes, los cuales pro- mueven de forma directa o indirecta el crecimiento en plantas mediante la obtención de nutrientes [17]. Los biofertilizantes son amigables con el medio ambiente, ya que el riesgo de contaminación ambiental es relativamente bajo en comparación con los fertilizantes nitrógenados. Además, tienen la habilidad de ayudar a controlar enfermedades de las plantas, mediante mecanismos como la competencia por nutrientes, limitando la proliferación de patógenos y por medio de la activación de genes de resistencia a distintas enfermedades[28]. Asimismo, se ha explorado la alternativa de emplear biofertilizantes con fertilizantes nitrogenados; ya que en conjunto se podría aumentar la producción agrícola y proteger la calidad microbiológica del suelo [30]. Un grupo específico de microorganismos empleados como biofertilizantes son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), las cuales son bacterias rizosféricas de vida libre con la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, favoreciendo su crecimiento mediante diversos mecanismos fisiológicos[72]. Estudios recientes han demostrado que los biofertilizantes compuestos por desechos orgánicos, nitrógeno mineral o con el uso de PGPR, mejoraron la eficiencia del nitrógeno y tiene efectos positivos cuantificables en las comunidades microbianas del suelo del cultivo [56].

5.4. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las PGPRs son de vida libre, colonizan la rizósfera y algunas pueden encontrarse en el tejido de las plantas. Estas bacterias generan efectos beneficiosos en el proceso de desarrollo en distintas especies vegetales [9]. Se han encontrado poblaciones de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en una alta cantidad en la rizosfera y como endófitos de muchos cultivos. Dentro de las especies más encontradas en las raíces de la caña de azúcar son : *Enterobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, y *Gluconacetobacter* [64]. Específicamente en el tejido vegetal de distintas variedades de caña de azúcar, se ha encontrado el género *Bacillus*, seguido por *Paenibacillus* (20 %), *Burkholderia* (14 %), *Herbaspirillum* (6 %), *Pseudomonas* (6 %), *Methylobacterium* (6 %) y *Brevibacillus* (3 %) [7].

Los mecanismos de acción de las PGPR que ayudan al crecimiento en las plantas se pueden dividir en dos, un mecanismo directo o indirecto. El mecanismo directo es caracterizado por facilitar la obtención de nutrientes o regular los niveles de hormonas vegetales. Dentro de este mecanismo se incluye la producción de auxinas, ACC desaminasa, citoquinina, giberelina, fijación de nitrógeno, y solubilización de fósforo [39]. El mecanismo indirecto se encuentra caracterizado por la habilidad de las bacterias para inhibir el funcionamiento de uno o más organismos patógenos. Mediante este mecanismo se observa la producción de ACC desaminasa, antibióticos, enzimas enfocadas en la degradación de la pared celular, competencia, cianuro de hidrógeno, resistencia sistémica inducida, interferencia con el sistema quorum sensing y producción de sideróforos [29]. Como se observa en la figura 3.2, las PGPR pueden actuar como agentes de biocontrol empleando los sideróforos que producen, ya que limitan la proliferación de fitopatógenos al impedir que adquieran suficiente hierro [30]. [74].

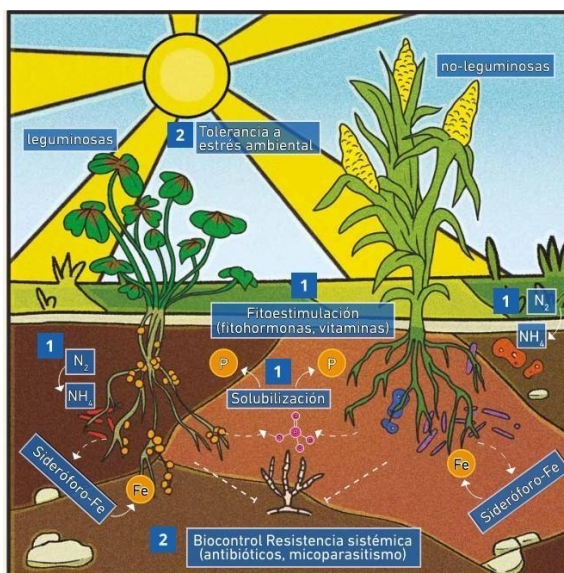


Figura 5.1: Mecanismo de acción de las PGPR, 1. Mecanismo directo, 2. Mecanismos indirectos [75]

La productividad y eficiencia de los cultivos aplicando las PGPR puede mejorarse aún más con la optimización y aclimatación de acuerdo con las condiciones predominantes del suelo. [1]. Tomando en consideración estos factores, existen diversos ejemplos en donde se han utilizado las PGPR para aumentar el rendimiento de diferentes tipos de cultivos. Por ejemplo, Jahanian y colaboradores [21], emplearon *Pseudomonas putida*, *Azospirillum*, y *Azotobacter* en la planta alcachofa (*Cynara scolymus*) y se observó un incremento en la longitud de los botes, el peso, en el coeficiente de germinación, entre otros factores. Además, se ha utilizado *Pseudomonas* sp. en el cultivo de trigo y soya, y se observó un incremento en las actividades enzimáticas del suelo, en la productividad y absorción de nutrientes [38]. Para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar, un estudio empleó tres especies de PGPR en conjunto con diferentes dosis de fósforo. Se analizó

que la combinación de *Azospirillum brasilense* y *Bacillus subtilis* mejoró la materia seca, el porcentaje de acumulación de fósforo y generó un incremento de 38 % en el número de tallos de este cultivo[83]. En otro estudio aplicado en caña de azúcar, se reportó que el uso de *B. subtilis* puede llegar a mejorar la fertilidad del suelo e incrementar el crecimiento de brotes y raíces[85].

5.4.1. Fijación biológica de nitrógeno

El proceso de la fijación biológica de nitrógeno es considerado como una alternativa para el uso de fertilizantes nitrogenados. Esta consiste en transformar el nitrógeno atmosférico (N_2) en una forma más simple, soluble (disponible) y no tóxica (NH_4^+) [40].

El ciclo biológico del nitrógeno es mediado por cuatro etapas: fijación, asimilación, nitrificación y desnitrificación de nitrógeno. Durante la fijación, el nitrógeno atmosférico se convierte a amonio (NH_4^+) con la ayuda de bacterias simbióticas. En el proceso de nitrificación, el nitrito (NO_2^-) es oxidado para formar nitrato (NO_3^-) mediante bacterias nitrificantes. Los nitratos no absorbidos por las plantas son reducidos a nitrito y, posteriormente, a nitrógeno molecular por las bacterias desnitrificantes. De esta manera, completando el ciclo del nitrógeno [43].

La fijación biológica de nitrógeno puede ser realizada por bacterias y arqueas. Esta clasificación incluye fijadores de nitrógeno de vida libre y fijadores asociativos y simbióticos.

- De vida libre: Microorganismos que colonizan la rizósfera pero no tiene la habilidad de colonizar el tejido vegetal[94] .
- Fijadores de nitrógeno asociativos: En la fijación asociativa existe una asociación causal entre plantas y diazótrofos[75].
- • Fijadores simbióticos: Los microorganismo simbióticos tiene la habilidad de formas nódulos en la raíz, por lo que fijan el nitrógeno dentro de los nódulos [82].

La fijación biológica de nitrógeno es catalizada por la enzima nitrogenasa, la cual se encuentra compuesta por dos componentes metálicos: la dinitrogenasa MoFe y la dinitrogenasa reductasa. Estos componentes son codificados por los genes *nif* ; específicamente la dinitrogenasa es formada por los productos de los genes *nifD* y *nifK*, y la dinitrogenasa reductasa por el gen *nifH* [25]. Es importante destacar que la nitrogenasa es sensible al oxígeno, por lo que en respuesta al oxígeno o señales redox, existen cuatro proteínas que regulan la fijación de nitrógeno: la histidina quinasa FixL, la histidina quinasa RegB, el antiactivador NifL y el activador dependiente de σ^{54} NifA [33].

5.5. Mejoramiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal

A pesar de los múltiples beneficios en el rendimiento y crecimiento de los cultivos al emplear las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, se han aplicado herramientas de ingeniería genética para mejorar y potenciar las capacidades de estas bacterias. Algunos ejemplos en los cuales se ha utilizado la ingeniería genética para lograr un mejoramiento es mediante la introducción de genes que codifican proteínas que mejoran la función beneficiosa de PGPB [45]. Asimismo, se ha utilizado la técnica de mutagénesis aleatoria para la mejora de procesos y producción de biomoléculas.

En el estudio realizado por Ramos y colaboradores ([79]), una cepa de *Pseudomonas* fue sometida a mutagénesis química empleando metil metanosulfonato, con el objetivo de mejorar su contribución a la nutrición de nitrógeno en maíz. De 13 cepas mutadas, 4 mostraron un aumento en la producción de amonio y de auxinas. Además, se realizaron ensayos de inoculación que demostraron un aumento de la biomasa de las

plantas de maíz, en condiciones limitantes de nitrógeno. Por lo que se estableció que la técnica de mutagénesis aleatoria generó cepas de PGPB con mayor potencial de suministrar nitrógeno. Además, en otro estudio con mutantes espontáneas resistentes a etilendiamina de *A. brasilense*, se observó que dos mutantes presentaron una actividad nitrogenasa en medio libre de nitrógeno de dos a tres veces mayor a comparación de las no mutadas. Incluso al ser expuestas a una atmósfera enriquecida con nitrógeno, ambos mutantes incorporaron cantidades significativas de nitrógeno en el material de raíz y brotes mucho mayores (835 y 695 ng de N) a comparación de la cepa tipo salvaje (474 ng de N) [21].

5.5.1. Mutaciones

Las mutaciones son cambios en la secuencia de nucleótidos de un organismo. Proceso que puede ocurrir debido a errores en la replicación del ADN o por la exposición a mutágenos como químicos o por irradiación [43]. La importancia de las mutaciones recae en su rol en los procesos evolutivos, ya que mediante estas mutaciones se genera diversidad genética entre organismos. Se pueden llegar a clasificar según su efecto en la aptitud de un organismo: las que generan una ventaja selectiva, las que disminuyen esta aptitud y las neutrales que no llegan a afectar la selección natural debido a su insignificante efecto [56].

5.5.2. Mutaciones aleatorias

Las mutaciones aleatorias son cambios que ocurren en ausencia de estrés aplicado o presión selectiva [16]. En el caso de las bacterias, la diversidad genética que se produce mediante este tipo de mutaciones llega a favorecer los procesos de colonización en el hospedero; mediante la resistencia a antibióticos, evasión del hospedero y mejoras en la habilidad de adaptación a nuevos ambientes. En cuanto a los procesos celulares que pueden llegar a promover la mutagénesis aleatoria se pueden incluir:

- Replicación de ADN: proceso semiconservativo en donde cada hebra parental posee la función de plantilla para la síntesis de una hebra complementaria. Una de las enzimas más importantes para este proceso es la ADN polimerasa [24].
- Transcripción: proceso en el cual un segmento específico de ADN es empleado como una plantilla para la síntesis de una molécula de ARN, lo cual se genera mediante la ayuda de la ARN polimerasa [67].
- Recombinación: intercambio de material genético entre un par de secuencias de ADN homólogo, las cuales pueden estar localizadas en dos copias del mismo cromosoma [5].
- Procesos metabólicos que generen especies reactivas de oxígeno [88].

Los mecanismos de las modificaciones generadas por mutagénesis aleatoria son las transiciones, proceso en el cual existe una substitución de un nucleótido de purina por otro de purina; transversiones, substitución de un nucleótido de purina por una pirimidina o al revés; deleciones, eliminación de uno o más nucleótidos de un gen; inserciones, incorporación de uno o más nucleótidos en un gen; e inversiones, rotación de 180° de un segmento de ADN de doble hebra [52].

5.5.3. Aplicaciones de la mutagénesis aleatoria

Debido a que la implementación de la mutagénesis aleatoria es fácil de realizar y económicamente razonable, se ha implementado para mejorar diversos procesos biológicos.

- • Industria de las micro algas: se ha empleado como una metodología para generar cepas más productivas (considerando factores como biomasa y los compuestos deseados), y para crear cepas más resistentes a factores ambientales [99].
- Mejora de proceso y producción de biomoléculas: Existe un estudio donde realizaron el proceso de mutagénesis aleatoria mediante radiación UV y metanosulfonato de etilo (EMS) para mutar *Chlorella vulgaris*. Se encontró que las cepas mutantes aisladas presentaron un 67 % de incremento en el contenido de lípidos y un incremento de 37 % en el contenido de biomasa [86]. Además, en otro estudio se empleó radiación UV en cepas de *Chlamydomonas reinhardtii*, y encontraron un 50 % de sobreproducción de esteroides y escualeno, y una mayor resistencia al estrés oxidativo [77].

5.5.4. Agentes mutagénicos

Los agentes mutagénicos son considerados como una herramienta para ajustar la tasa de mutaciones de una forma artificial para su futura aplicación. Para realizar la mutagénesis aleatoria, se pueden emplear agentes mutagénicos químicos como físicos [91]. En el grupo de los químicos se incluyen compuestos como acriflavina, metanosulfonato de etilo (EMS), sulfato de dietilo, y metilnitrosoguanidina (MNNG)[15]. En el caso de los físicos se realiza mediante la aplicación de dosis de radiación a células con radiación UV, laser, rayos X, irradiación de iones pesados y gamma. La irradiación UV se encuentra clasificada en tres grupos: UV-C (190-290nm), UV-B (290-320nm) y UV-A(320-400nm). Específicamente el ADN absorbe a 260nm[20].

5.5.5. Radiación Ultra Violeta -UV-

El mecanismo de acción de la radiación Ultra Violeta (UV) consiste en la absorción de parte de las moléculas de ADN, generando un enlace covalente de pirimidinas; por lo que se forma dímeros que impiden el emparejamiento normal de bases y cambian la estructura de doble hélice del ADN. Donde se genera dos fotoproductos principales: dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) y los fotoproductos de 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPs), en donde se observa sus estructuras en la figura 3.3 [20]. La reparación por escisión de nucleótidos bacterianos (NER) es la ruta principal de reparación de lesiones de ADN provocadas por radiación UV. La cual es una ruta que fue observada por primera vez en un estudio con *Escherichia coli*, donde se analizó que la radiación UV causaba una reparación de tramos cortos de ADN, indicando que el método de reparación consistía en eliminar nucleótidos completos dañados [41].

Se ha investigado que existe una diferencia en la sensibilidad a la radiación con UV en distintas fases de crecimiento bacteriano, específicamente una mayor sensibilidad durante la fase exponencial de crecimiento a comparación de la fase estacionaria. En la fase exponencial, las células se encuentran en un estado de proliferación activa, por lo que más ADN se encuentra expuesto a posibles daños por radiación [66]. En el caso de *Escherichia coli*, se ha estudiado una mayor resistencia a la radiación UV en la fase estacionaria, a comparación de la fase exponencial. Sugiriendo un posible aumento en los mecanismos de reparación de ADN durante la fase estacionaria o una menor tasa de replicación que permite mayor tiempo de reparación del ADN [1].

Se ha estudiado que el proceso de mutagénesis aleatoria empleando radiación UV ha generado mejoramientos de características en bacterias, hongos, microalgas y plantas. En un estudio reciente se analizó el efecto de utilizar radiación UV para generar una mutagénesis aleatoria en cepas de *Bacillus subtilis*, para la selección de productores de proteasas. Como parte del estudio se determinó que dos cepas mutantes obtuvieron un incremento de producción de proteasas de 45.63 % y 41.39 %, a comparación con las cepas wild type [59]. En cuanto al uso de este método para la mejora de rasgos de calidad y rendimiento, encontraron que luego de un tratamiento con UV a microesporas de *Brassica napus*, se observó una reducción en el contenido de glucosinolato [12]. Además en otro estudio, se ha empleado UV-C en la microalga *Scenedesmus obliquus*, y se ha analizado la productividad de ácidos grasos trans y se estableció que el mutante *slm1* a comparación

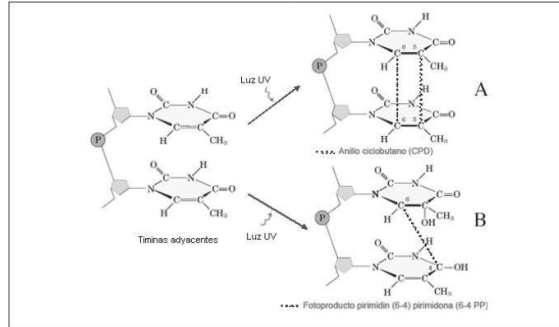


Figura 1. Formación de dímeros de timina inducido por la radiación UV. A: Dímero *cis*-*syn* ciclobutano (CPD). B: Fotoproducto pirimidin(6-4) pirimidona (6-4PP).

Figura 5.2: Mecanismo de acción de la radiación Ultra Violeta. A: Fotoproducto : dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs). B: Fotoproducto de 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPs) [40].

del tipo salvaje incrementó el contenido de triacilglicerol por un 57 % [17]. Shahid y colaboradores [90], utilizaron irradiación UV con el objetivo de aumentar las características de una cepa PGPR *Bacillus* sp. tolerante a metales. Dos de los mutantes, mostraron un aumento *in vitro* en la solubilización de fosfato y la producción de amoníaco a comparación de la cepa original. Estos mutantes fueron inoculados en plantas de trigo, los cuales mantuvieron la densidad poblacional óptima, y aumentaron la biomasa y longitud de la raíz y tallo. Watanabe y colaboradores [103] generaron un mutante de *Pichia stipitis* mediante el uso de irradiación UV, con el propósito de aumentar la productividad de etanol de la levadura. El mutante produjo 4.3 % de etanol a partir de xilosa, en comparación del 3.1 % de la cepa original. El objetivo de generar esta cepa mutada era para aplicarla en el proceso de fermentación de biomasa lignocelulósica, donde la conversión de pentosas a etanol es un paso importante.

5.6. Método espectrofotométrico

La espectrofotometría es una técnica que consiste en medir la interacción de la luz con un material. Donde a medida que la luz interactúa con el material, esta puede ser reflejada, transmitida, dispersada o absorbida. Por lo que la cantidad de radiación específica (fotón) absorbida o reflejada por la muestra, es relativa a la intensidad en una longitud de onda particular. Esta técnica es ampliamente utilizada en los laboratorios farmacéuticos, químicos, bioquímicos y de biología molecular para la identificación y cuantificación de diferentes muestras, [27].

Específicamente la técnica de espectrofotometría de radiación ultravioleta y luz visible, se basa en el principio de la atenuación de la medición de la radiación electromagnética por una sustancia absorbente, en el rango espectral de 190-800nm. Donde la ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia es proporcional a la concentración del analito de interés y a la distancia de la luz cuando atraviesa el analito en el proceso de irradiación. En cuanto al equipo utilizado, este se conoce como espectrofotómetro, y sus componentes esenciales son una fuente de luz/radiación, un colimador, un monocromador y un detector [76].

Esta técnica puede ser aplicada para estudiar el proceso de fijación de nitrógeno en bacterias. En el estudio de Córdova y colaboradores [25], se presenta el uso de este método espectrofotométrico para estimar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de las bacterias cultivadas en un medio líquido libre de nitrógeno. Basándose en la variación de la absorbancia generada por el cambio de tonalidad del azul de bromotimol en el medio de cultivo.

6.1. Sitio de estudio

La presente investigación se llevo a cabo en el Departamento de Bioquímica y Microbiología y en el Centro de Estudios de Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala.

6.2. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Es una investigación experimental con un enfoque de investigación cuantitativa.

6.3. Tipo y tamaño de muestra

La población de estudio son las bacterias diazotróficas aisladas del suelo de caña de azúcar, las cuales se encuentran en un cepario realizado por Valeria Ochoa[17]. La cantidad de cepas a utilizar son 6, las cuales fueron seleccionadas debido a que tienen una capacidad de fijar nitrógeno.

6.4. Hipótesis

6.4.1. Hipótesis de investigación

La aplicación de mutagénesis aleatoria con radiación UV en bacterias diazotróficas presentará un mejoramiento en las capacidades fijadoras de nitrógeno, a comparación de las cepas no mutadas

6.4.2. Hipótesis nula

La aplicación de mutagénesis aleatoria con radiación UV en bacterias diazotróficas no presentará un mejoramiento en las capacidades fijadoras de nitrógeno, a comparación de las cepas no mutadas

6.5. Variables

Tabla 6.1: Definición de variable

Variable	Definición	Naturaleza	Unidades de medición
Concentración de nitrógeno	Habilidad de las cepas bacterianas de transformar el nitrógeno atmosféricos (N ₂) en una forma más simple, soluble y no tóxica (NH ₄ ⁺)	Cuantitativa	µg/ml
Tiempo	Tiempo de exposición a la radiación UV	Cuantitativa	Segundos

6.6. Metodología

6.6.1. Reaislamiento y purificación de las cepas seleccionadas

La selección de las cepas bacterianas de interés fueron determinadas en base a sus características bioquímicas, específicamente su capacidad de fijar nitrógeno, las cuales fueron analizadas por Valeria Ochoa [17]. Además, en el estudio realizado por Say [2] la cepa 2MO12 fue identificada con genes asociados a la fijación de nitrógeno. Para reaislar las cepas bacterianas de interés, se tomó 10µl de la bacteria del cepario en 990µl de caldo LB para realizar el cultivo toda la noche. Luego de una incubación de 24 horas a 37°C, las muestras que no presentaron crecimiento luego de este tiempo, se volvieron a dejar toda la noche, donde en un tubo falcon de 15ml se colocó 1ml del cultivo dejado toda la noche en 4ml de caldo LB. Se inoculó en agar nutritivo y se dejó incubar por 24 horas.

6.6.2. Método espectrofotométrico para la estimación de la fijación de nitrógeno de bacterias diazótroficas

Para la estandarización de la curva estándar para la cuantificación de nitrógeno, se realizó una curva con 23 soluciones a diferentes concentraciones, a las cuales se le midieron su valor de absorbancia a 610nm en el espectrofotómetro de la marca UNICO. Con la ecuación de regresión lineal obtenida, se determinó la cantidad de nitrógeno fijada por las cepas seleccionadas. En el POE 20 se encuentra a detalle la metodología utilizada para estimar la cuantificación de nitrógeno.

6.6.3. Mutagénesis aleatoria mediante el uso de radiación Ultra Violeta

Antes de realizar el proceso de mutagenésis aleatoria, se estandarizó el método para cada especie bacteriana. Lo cual se realizó mediante un conteo de las colonias supervivientes ante la exposición de irradiación UV. Mediante el conteo de las colonias supervivientes para cada especie se estableció el rango adecuado de exposición a la irradiación UV. Además, se elaboraron curvas de crecimiento en caldo LB y caldo libre de nitrógeno, con el objetivo de establecer el tiempo específico en la cual las bacterias empiezan su fase logarítmica de crecimiento. En el POE 22 se encuentra a detalle la metodología utilizada para la realización de las curvas de crecimiento.

Con base a la metodología descrita por del Cid [22], se realizó una solución estándar de McFarland 0.5 y se realizaron diluciones seriadas de los cultivos de las bacterias seleccionadas. Luego de su siembra en placas de agar NFB, se expusieron a radiación UV por intervalos de 0-4 segundos. Se incubaron por 24 horas, y se realizó el conteo de colonias. Al ser recolectadas, se cuantificó la cantidad de nitrógeno fijado siguiendo la misma metodología del POE 20. En el POE 21 se encuentra a detalle la metodología utilizada para estimar la cuantificación de nitrógeno.

6.6.4. Análisis estadístico

Se analizaron los datos obtenidos mediante el software RStudio-2023.12.0-369. En donde para establecer si los datos seguían una distribución normal, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En el caso que seguían una distribución normal se realizó la prueba t de Estudiante, y un ANOVA. En el caso que no seguían una distribución normal, se realizó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para comparar las medianas de los grupos independientes.

6.6.5. Elaboración de un cepario de las bacterias diazotróficas mutadas con una alta capacidad de fijar nitrógeno

Mediante el análisis estadístico, se determinó que cepas tuvieron un cambio en sus capacidades de fijar nitrógeno para implementarlas en un cepario nuevo. Por lo que se inoculó una colonia en 1ml de medio nutritivo, la cual se dejó incubado durante la noche. Luego se tomó 500 ul del cultivo y colocó en un nuevo tubo. Se agregó 500 uL de glicerol al 40 %. Inmediatamente se colocan en el congelador a -80oC.

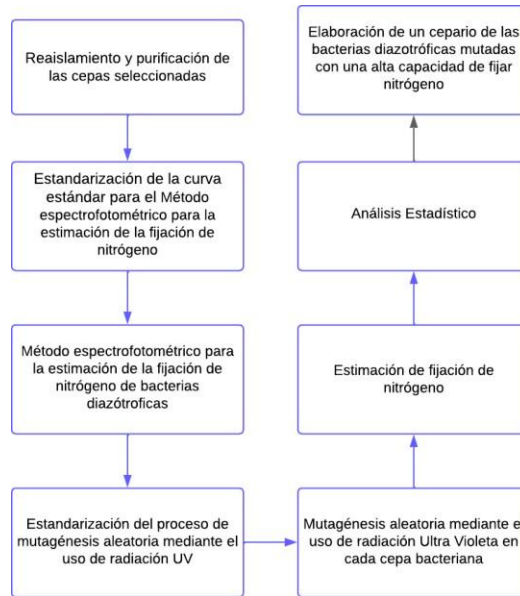


Figura 6.1: Diagrama de flujo de la metodología resumida.

7.1. Uso y validación de la curva estándar

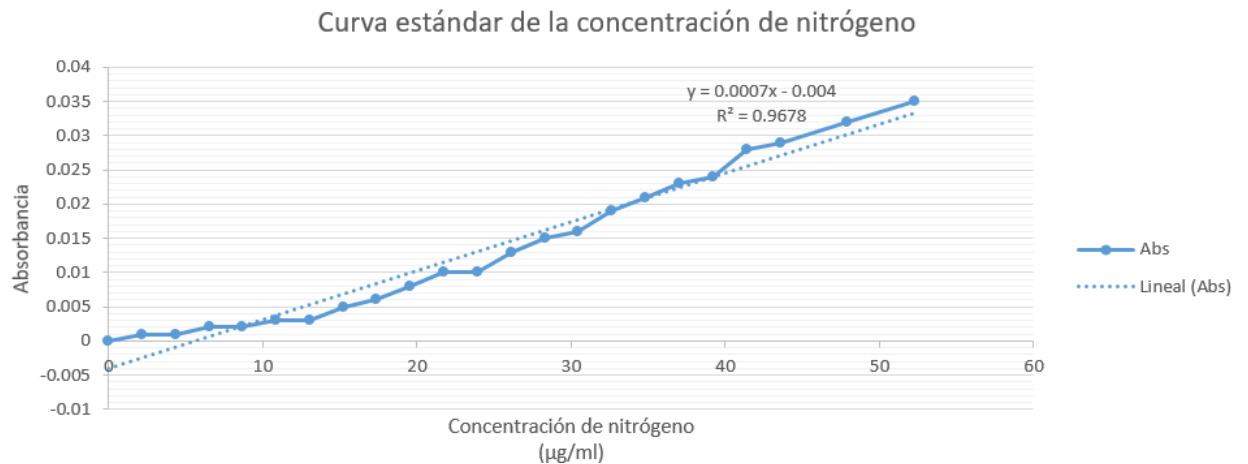


Figura 7.1: Curva estándar de la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo NFb versus absorbancia. La línea de regresión es representada por la ecuación $y=0.0007x-0.004$, donde y corresponde a la absorbancia y x corresponde a la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo.

Se empleó el método espectrofotométrico para la realización de la curva estándar, donde la concentración de nitrógeno fue estimada a partir de los iones de amonio en el medio de cultivo. En la figura 6.1 se observa una correlación positiva entre las concentraciones de nitrógeno y los valores de absorbancia medidos a 610nm, obteniendo un valor de R^2 de 0.9678. El valor obtenido para el R^2 indica que el modelo se ajusta bien a los datos.

Tras el análisis de varianza (ANOVA) para las medias de la concentración de nitrógeno fijado por las distintas cepas bacterianas, se establece que existe una diferencia significativa entre las concentraciones de

nitrógeno fijado entre las cepas, dado a que el valor p (3.85e-07) es menor a 0.05. Acorde al resultado de la prueba Shapiro-Wilk presentado en el Cuadro 7.2, con un valor p de 0.3288, se puede establecer que los residuos del modelo ANOVA siguen una distribución normal. Debido a que se obtuvo un valor p (0.9753) mayor a 0.05 en la prueba de Levene, se establece que las varianzas de las concentraciones de nitrógeno fijado por las distintas cepas son similares (ver Cuadro 7.3). De acuerdo con los resultados anteriores, se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas del ANOVA.

Fuente de variación	Df	Suma de cuadrados	Media cuadrática	valor F	Pr(>F)
Cepa	6	4923	820.6	38.27	3.85e-07 ***
Residuals	12	257	21.4		

Cuadro 7.1: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para los datos de fijación de nitrógeno por las distintas cepas bacterianas¹

Test	Valor
Test de Normalidad de Shapiro-Wilk	
W	0.94538
valor-p	0.3288

Cuadro 7.2: Test de Normalidad de Shapiro-Wilk

Fuente	valor F	Pr(>F)
grupo	0.1855	0.9753

Cuadro 7.3: Test de Homogeneidad de Varianzas de Levene

Debido a la diferencia significativa obtenida en el análisis de ANOVA, se realizó una prueba post-hoc de Tukey (ver Cuadro 7.4). Al analizar el cuadro, se observa que las cepas *Bacillus paramycoides* (1BP10), *Bacillus subtilis* (2MO12), y *Bacillus cereus* (4AP9) cuentan con diferencias significativas entre sus medias de la concentración de nitrógeno fijada en comparación con otras cepas como *Pseudomonas baetica* (1AB27). Donde la cepa *Bacillus paramycoides*, parece mostrar la mayor diferencia significativa frente a la cepa *Pseudomonas baetica*. Entre las cepas *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, y el grupo de cepas *Burkholderia cepacia* y *Bacillus cereus*, sus valores p indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre estas cepas en cuanto a su capacidad de fijar nitrógeno.

¹Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Comparación	diff	lwr	upr	p adj
1BP10-1AB27	30.953333	17.7210636	44.1856031	4.544333e-05
2AP10-1AB27	12.856667	-0.3756031	26.0889364	5.890354e-02
2MO12-1AB27	15.236667	2.0043969	28.4689364	2.070028e-02
2MO14-1AB27	18.570000	5.3377302	31.8022698	4.862015e-03
4AP9-1AB27	28.096667	14.8643969	41.3289364	1.197235e-04
Blanco-1AB27	-39.043333	-57.7565887	-20.3300779	1.422065e-04
2AP10-1BP10	-18.096667	-31.3289364	-4.8643969	5.952279e-03
2MO12-1BP10	-15.716667	-28.9489364	-2.4843969	1.675883e-02
2MO14-1BP10	-12.383333	-25.6156031	0.8489364	7.231655e-02
4AP9-1BP10	-2.856667	-16.0889364	10.3756031	9.852974e-01
Blanco-1BP10	-69.996667	-88.7099221	-51.2834113	2.899240e-07
2MO12-2AP10	2.380000	-10.8522698	15.6122698	9.942743e-01
2MO14-2AP10	5.713333	-7.5189364	18.9456031	7.343319e-01
4AP9-2AP10	15.240000	2.0077302	28.4722698	2.066991e-02
Blanco-2AP10	-51.900000	-70.6132554	-33.1867446	7.720627e-06
2MO14-2MO12	3.333333	-9.8989364	16.5656031	9.687974e-01
4AP9-2MO12	12.860000	-0.3722698	26.0922698	5.881816e-02
Blanco-2MO12	-54.280000	-72.9932554	-35.5667446	4.781969e-06
4AP9-2MO14	9.526667	-3.7056031	22.7589364	2.337255e-01
Blanco-2MO14	-57.613333	-76.3265887	-38.9000779	2.512890e-06
Blanco-4AP9	-67.140000	-85.8532554	-48.4267446	4.643548e-07

Cuadro 7.4: Resultados del test de Tukey 2

2diff (diferencia de medias), lwr (límite inferior del intervalo de confianza), upr (límite superior del intervalo de confianza), y p adj (valor p ajustado) Se observa que la diferencia de medias entre la cepa *Bacillus paramycoides* (1BP10) y *Bacillus cereus* (4AP9) es de -2.85, valor negativo indicando que la cepa *Bacillus paramycoides* cuenta con una media mayor. No obstante, su valor p es de 9.85e-01, este es un valor mayor a 0.05, indicando que no existe una diferencia significativa. Valor p (4.54e-05) obtenido para la cepa *Bacillus paramycoides* (1BP10) y *Pseudomonas baetica* (1AB27), indica una diferencia estadísticamente significativa. Valor p (0.0207) obtenido para la cepa *Bacillus subtilis* (2MO12) y *Pseudomonas baetica* (1AB27), indica diferencia estadísticamente significativa. Valor p (0.9942) obtenido para la cepa 2MO12 y *Bacillus cereus* (2AP10) indica que no existe una diferencia significativa entre sus medias.

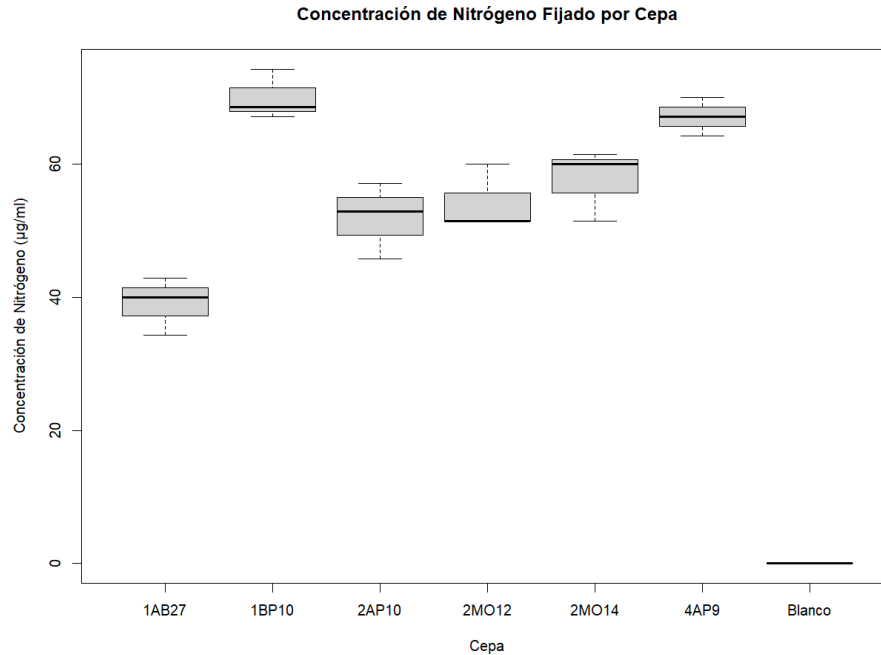


Figura 7.2: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada mediante el método espectrofotométrico, previo a la irradiación con UV. Código de las cepas: *Pseudomonas baetica* (1AB27), *Bacillus paramycoides* (1BP10), *Bacillus cereus* (2AP10), *Bacillus subtilis* (2MO12), *Burkholderia cepacia* (2MO14), y *Bacillus cereus* (4AP9).

En la Figura 7.2 se observa los resultados de la cantidad de nitrógeno fijado por las bacterias de suelo, lo cual fue estimado por la ecuación de la línea ajustada del método espectrofotométrico. El análisis estadístico ANOVA, complementado con la prueba post-hoc de Tukey, respalda los resultados observados en el gráfico de caja de bigotes. Al analizar la figura, se aprecia que las cepas *Bacillus paramycoides* (1BP10), *Bacillus subtilis* (2MO12) y *Bacillus cereus* (4AP9) muestran medianas más altas y distribuciones que indican una mayor capacidad para fijar nitrógeno en comparación con otras cepas, como *Pseudomonas baetica* (1AB27), cuya concentración es significativamente menor. Según la prueba de Tukey, la cepa *Bacillus paramycoides* (1BP10) destaca por tener una diferencia significativa más marcada frente a *Pseudomonas baetica* (1AB27).

7.2. Curvas de crecimiento bacteriano

En la Figura 7.3, se observa el inicio de la fase exponencial luego de aproximadamente 80 minutos, empleando el caldo de cultivo LB. En el caso del medio libre de nitrógeno (Figura 7.4), se observó el inicio de la fase exponencial luego de 300 minutos. Además, se observa como en este medio libre de nitrógeno se presenta un crecimiento más limitado y variable a comparación con el medio enriquecido.

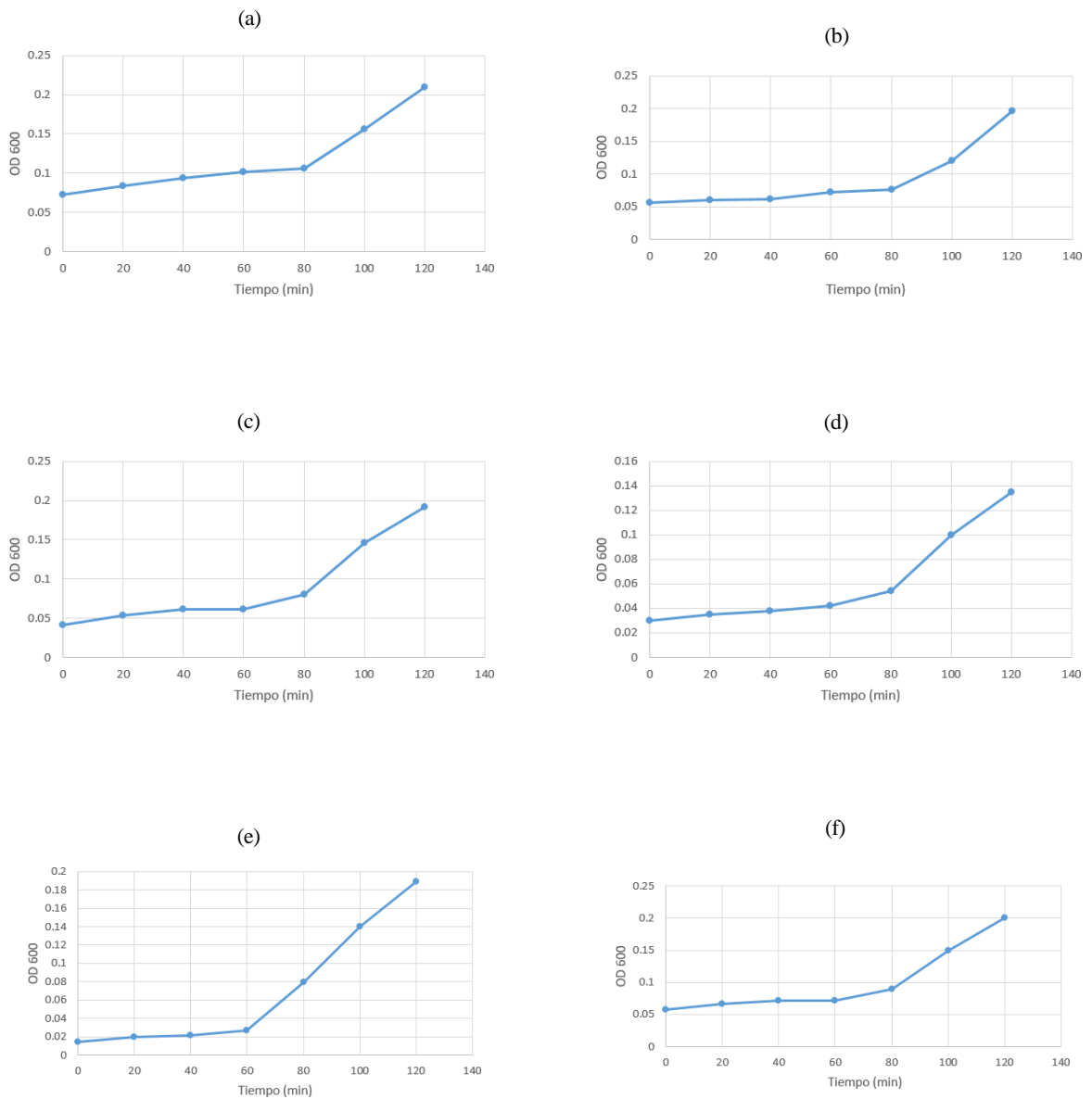


Figura 7.3: Curvas de crecimiento bacteriano en caldo Luria-Bertani (LB). Curva de crecimiento para *Pseudomonas baetica*, se observa un crecimiento constante alcanzando un OD600 cercano a 0.2 (a). Curva de crecimiento para *Bacillus paramycoides*, patrón de crecimiento constante, ligeramente más lento a comparación de la curva a (b). Curva de crecimiento para *Bacillus cereus* (c). Curva de crecimiento para *Bacillus subtilis*, se observa una tasa de crecimiento más lenta, alcanzado un valor OD600 menor a 0.2(d). Patrón de crecimiento similar(c y f). Curva de crecimiento para *Burkholderia cepacia*, inicio de fase de crecimiento exponencial más rápida a comparación de las demás curvas de crecimiento (e). Curva de crecimiento para *Bacillus cereus* (f).

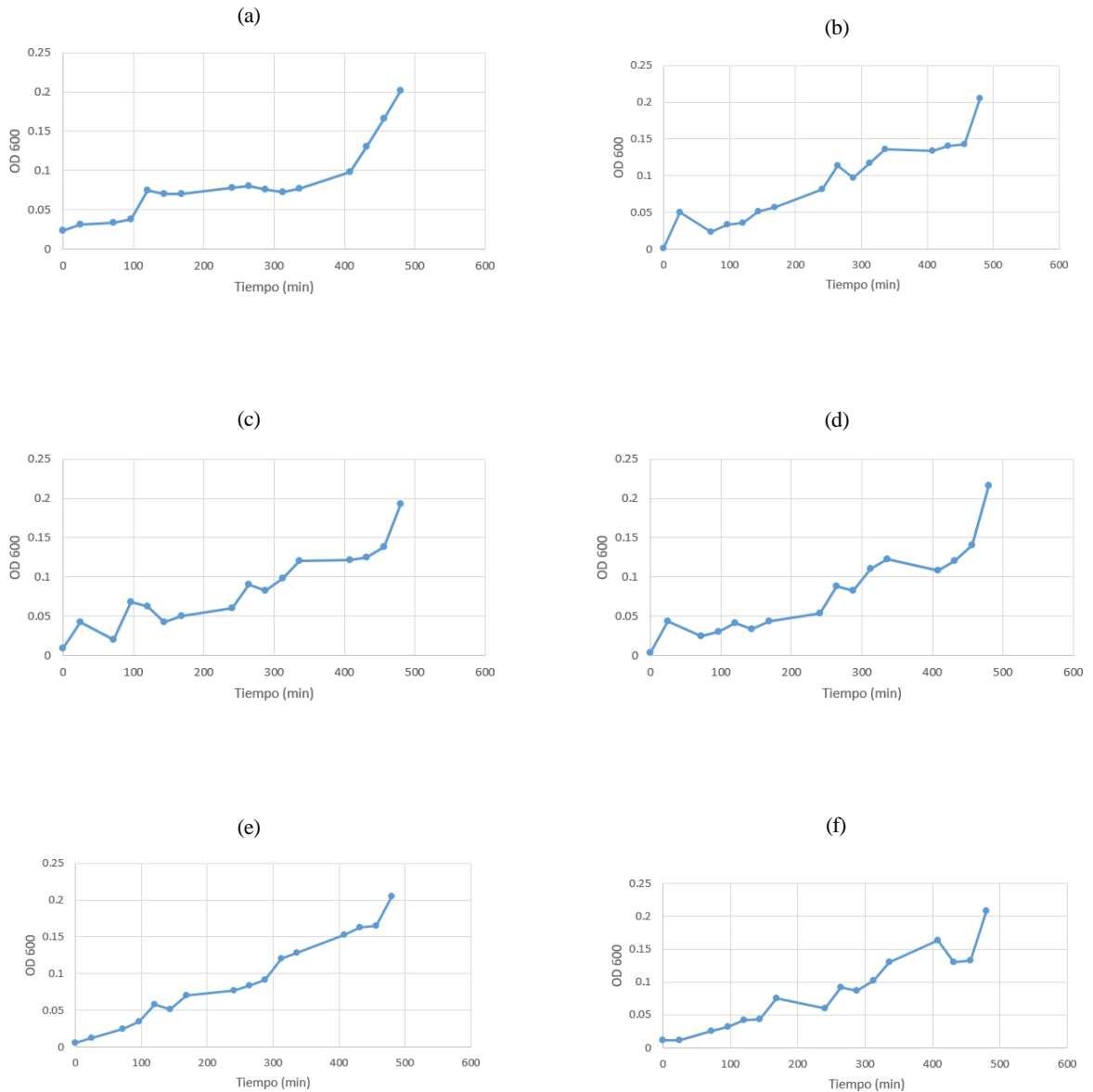


Figura 7.4: Curvas de crecimiento bacteriano en caldo NFb. Curva de crecimiento para *Pseudomonas baetica*, patrón de crecimiento gradual (a). Curva de crecimiento para *Bacillus paramycoides* (b), curva de crecimiento constante, menos pronunciada a comparación con *Pseudomonas baetica*. Curva de crecimiento para *Bacillus cereus* (c). Cuentan con un patrón de crecimiento gradual alcanzando un OD600 cercano a 0.2 (c y f). Curva de crecimiento para *Bacillus subtilis* (d). Curva de crecimiento para *Burkholderia cepacia*, se observa un patrón de crecimiento más lineal (e). Curva de crecimiento para *Bacillus cereus* (f).

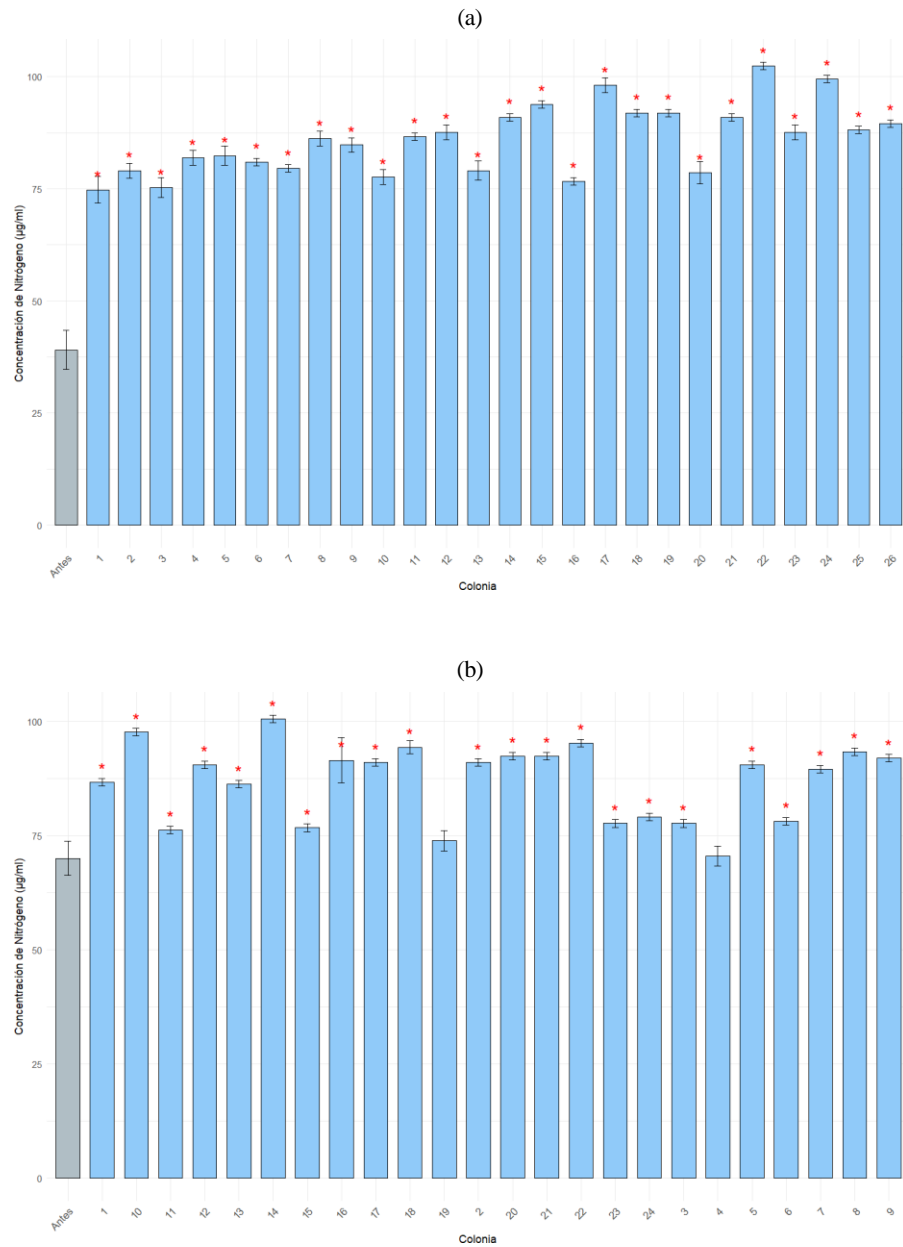


Figura 7.5: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada previo y luego de la irradiación con UV. *: corresponde a un valor $p < 0.05$, por lo que existe diferencia significativa entre la concentración fijada previo y post a la irradiación. Concentración de nitrógeno fijada por *Pseudomonas baetica* (a). Concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus paramycooides* (b). Mediciones realizadas en triplicado y con una dosis de radiación de 3 segundos.

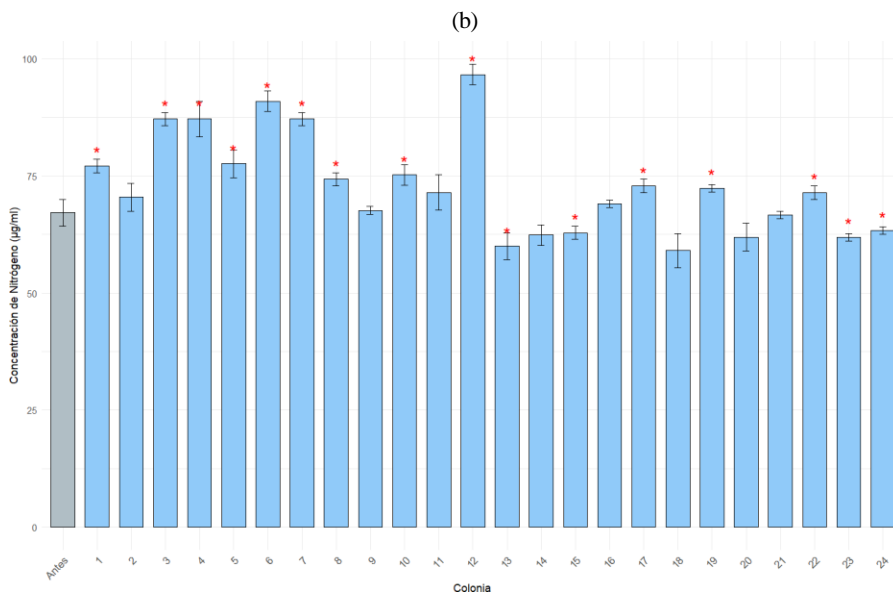
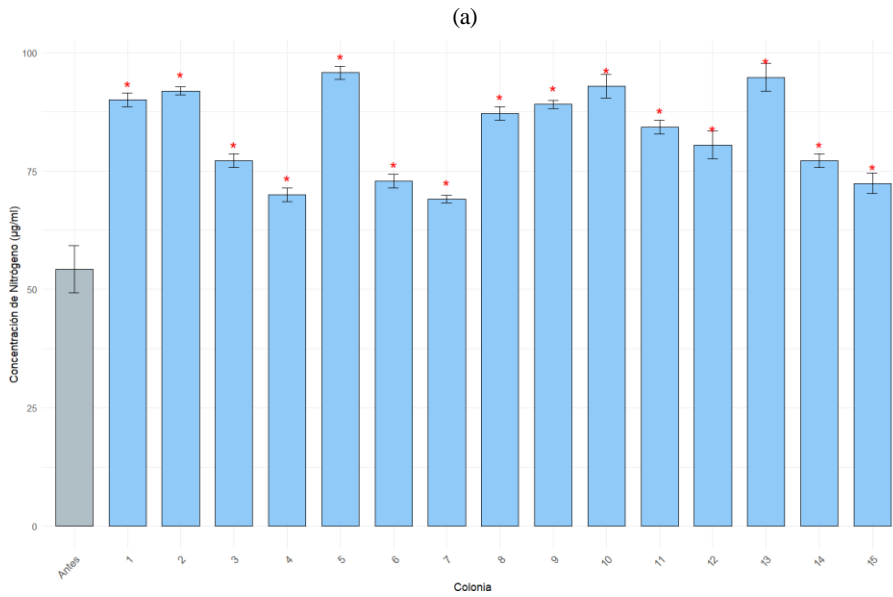


Figura 7.6: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada previo y luego de la irradiación con UV. *: corresponde a un valor $p < 0.05$, por lo que existe diferencia significativa entre la concentración fijada previo y post a la irradiación. Concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus subtilis* (a). Concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus cereus* (b). Mediciones realizadas en triplicado y con una dosis de radiación de 3 segundos.

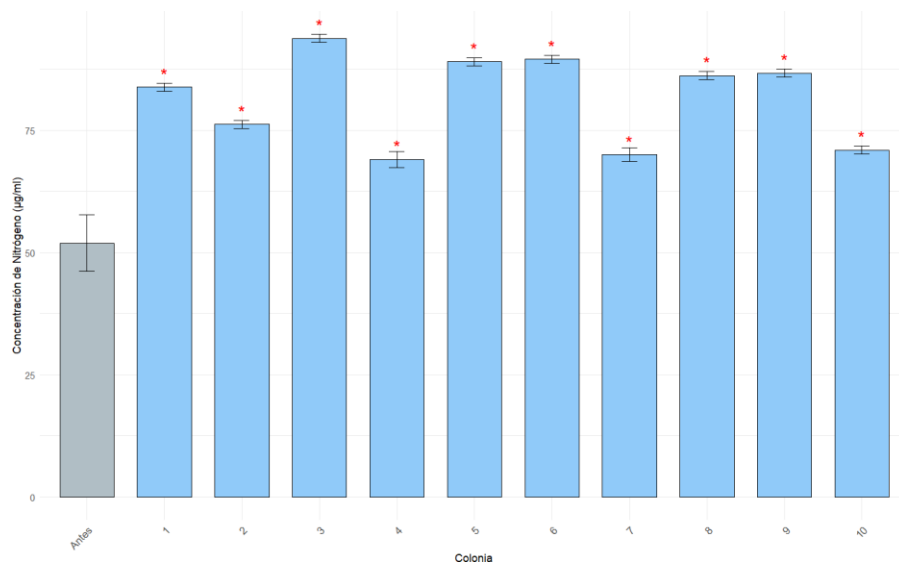


Figura 7.7: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus cereus* previo y luego de la irradiación con UV. *: corresponde a un valor $p < 0.05$, por lo que existe diferencia significativa entre la concentración fijada previo y post a la irradiación. Mediciones realizadas en triplicado.

Para evaluar si existían diferencias estadísticas en la concentración de nitrógeno fijado antes y después de la radiación con UV, se realizaron pruebas t para comparar las medias de la concentración de las colonias mutadas y no mutadas. En la Figura 7.5 (a), se observa que todas las colonias mutadas de la cepa *Pseudomonas baetica* son estadísticamente diferentes con respecto a la media de la concentración de nitrógeno de la cepa control, debido a que sus valores p son menores a 0.05. En la gráfica (b), correspondiente a la cepa *Bacillus paramycoides*, únicamente las colonias 19 y 4 no cuentan con diferencias significativas en sus medias de concentración de nitrógeno con respecto al valor de concentración de la colonia control, dado a que sus valores p son mayores a 0.05.

En la Figura 7.6 (a), se obtuvo que las colonias 1 a 15 de la cepa *Bacillus subtilis* son estadísticamente diferentes con respecto a la media de la concentración de nitrógeno de la cepa control, debido a que sus valores p son menores a 0.05. En la gráfica (b) se aprecia que las colonias 2, 9, 11, 14, 16, 20 y 21 para la cepa *Bacillus cereus* presentan valores p mayores a 0.05, indicando que no existe una diferencia significativa entre sus medias de concentración en comparación con la colonia control. Las 10 colonias analizadas para *Bacillus cereus* presentaron una capacidad significativamente mayor de fijación de nitrógeno luego de la irradiación, en comparación con la colonia no expuesta a la irradiación (ver Figura 7.7). Para el caso de la cepa *Burkholderia cepacia*, no fue posible obtener colonias mutadas, por lo que únicamente se evaluó su capacidad de fijar nitrógeno previo a la irradiación.

Tras el análisis estadístico con las pruebas t, se identificaron las colonias de cada cepa bacteriana con la mayor capacidad de fijar nitrógeno. En la Figura 7.8, se destaca que la colonia 22 presentó una diferencia en la concentración de nitrógeno de $63.34 \mu\text{g/ml}$, a comparación de la colonia control, siendo esta la mayor diferencia observada entre las capacidades de fijación de nitrógeno de la colonia mutada y la control. Para la cepa *Bacillus paramycoides*, la colonia 14 presentó una diferencia de $30.48 \mu\text{g/ml}$ en la concentración de nitrógeno a comparación de la colonia control. Para la cepa *Bacillus subtilis*, la colonia 5 obtuvo una diferencia de $41.43 \mu\text{g/ml}$. Se observó que la colonia 12 para *Bacillus cereus*, fue la que presentó la menor diferencia en su capacidad de fijar nitrógeno a comparación de la colonia control, ya que solamente obtuvo una diferencia de $29.53 \mu\text{g/ml}$. En la Figura 7.12, la colonia 3 para *Bacillus cereus*, obtuvo una diferencia similar ($41.91 \mu\text{g/ml}$) con el valor obtenido para la colonia 5 de *Bacillus subtilis* ($41.43 \mu\text{g/ml}$).

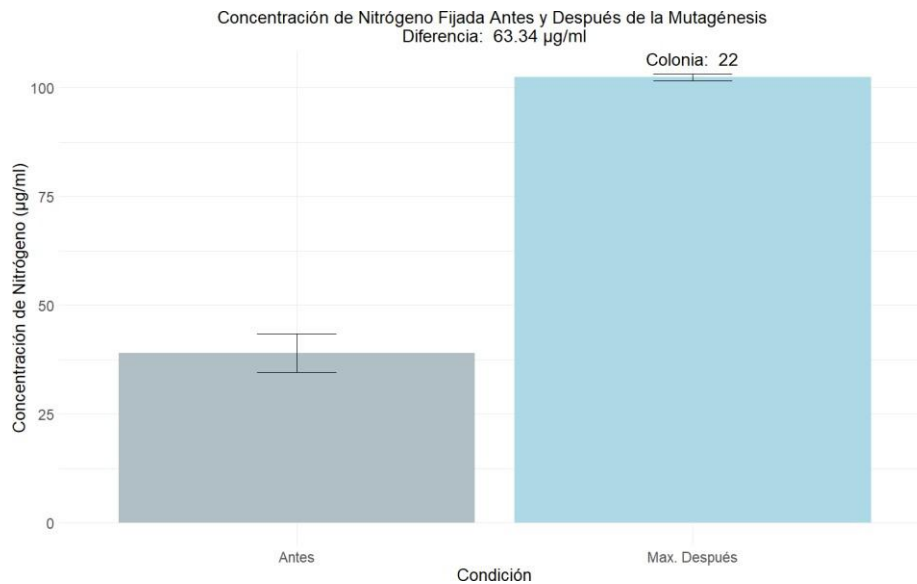


Figura 7.8: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por *Pseudomonas baetica* previo y luego de la irradiación con UV.

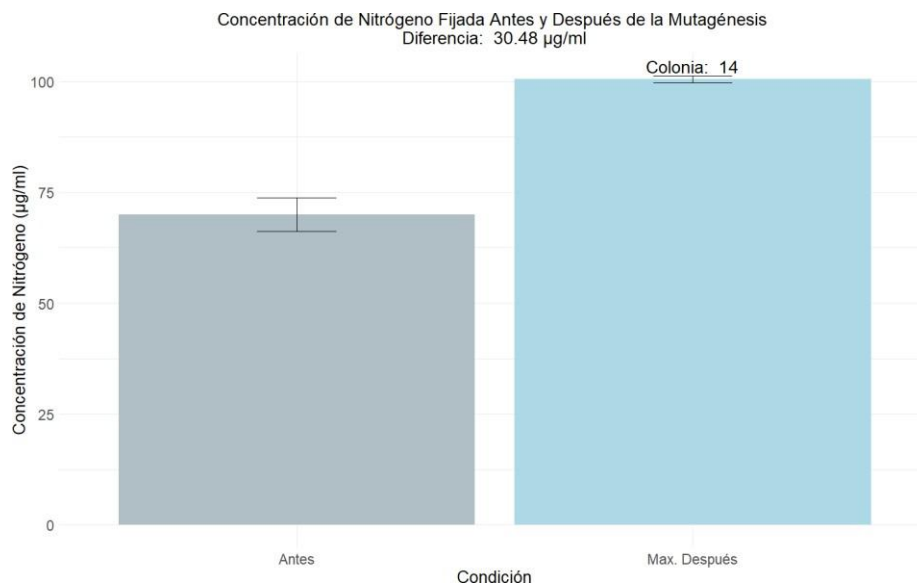


Figura 7.9: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus paramycoides* previo y luego de la irradiación con UV.

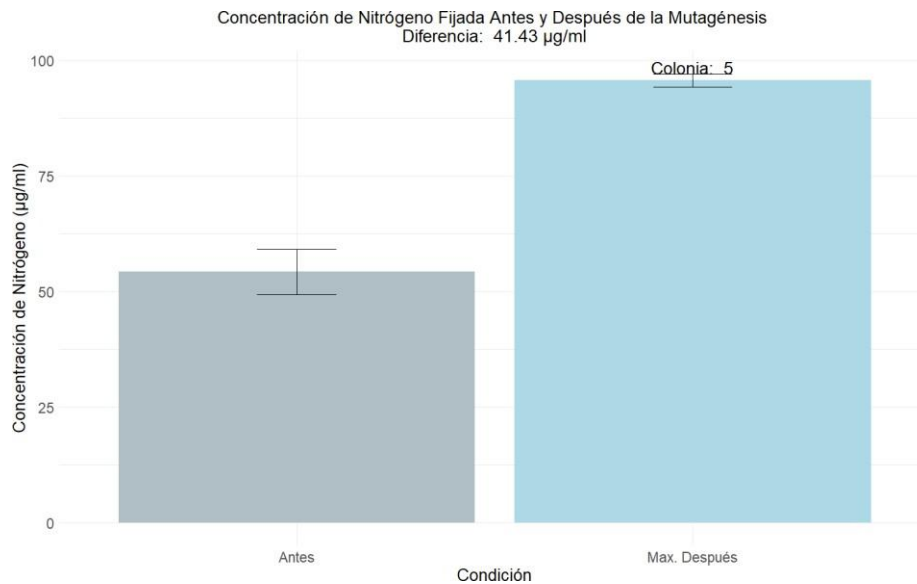


Figura 7.10: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus subtilis* previo y luego de la irradiación con UV.

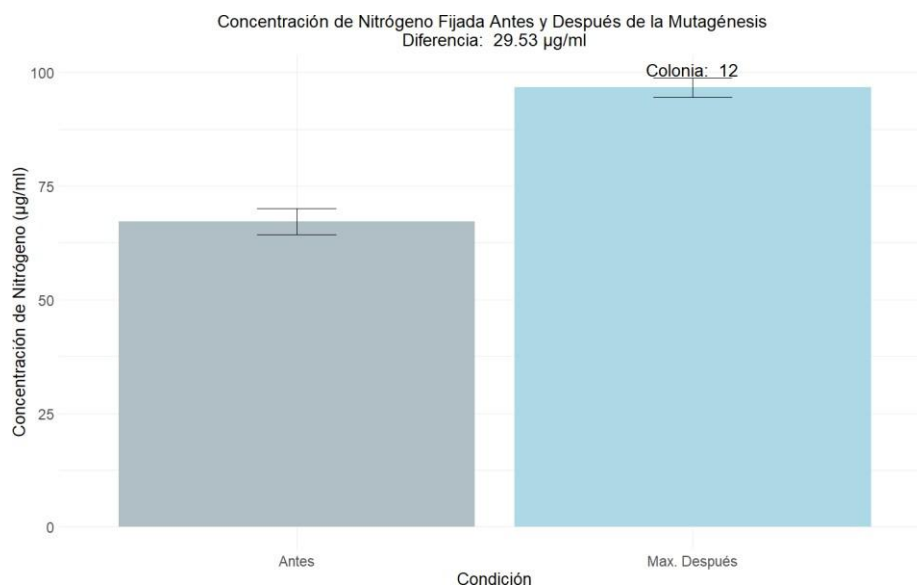


Figura 7.11: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus cereus* previo y luego de la irradiación con UV.

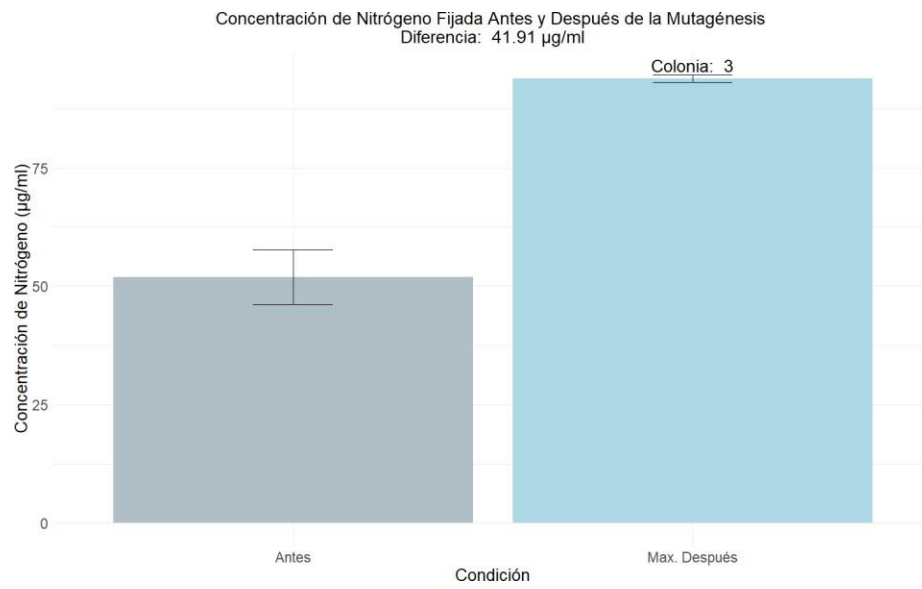


Figura 7.12: Visualización de la concentración de nitrógeno fijada por *Bacillus cereus* previo y luego de la irradiación con UV.

Discusión

El presente estudio tenía como propósito determinar si los mutantes producidos por mutagénesis aleatoria podían poseer una mejor capacidad fijadora de nitrógeno comparada con las cepas originales. Para esto, se realizó una curva estándar empleando un método espectrofotométrico, permitiendo estimar la cantidad de nitrógeno fijada por estas bacterias de suelo directamente en el medio de cultivo. Las mediciones de la concentración fijada de nitrógeno en el medio de cultivo NFb se realizaron previo a la irradiación con UV y posteriormente a la irradiación, de esta manera se evaluó el efecto de las mutaciones inducidas por parte de la radiación UV en el proceso de fijación del nitrógeno.

El nitrógeno fijado por la distintas cepas bacterianas se analizó mediante la prueba estadística de Tukey, donde las cepas *Bacillus paramycooides*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus cereus* cuentan con diferencias significativas entre sus medias de la concentración de nitrógeno fijada en comparación con otras cepas. Se puede concluir que las cepas del género *Bacillus* demostraron una capacidad fijadora de nitrógeno mayor en comparación con las otras cepas bacterianas, como se aprecia en la Figura 7.2. La variabilidad observada en la fijación de nitrógeno entre las distintas cepas bacterianas subraya la relevancia del género *Bacillus*, donde se ha reportado actividad de fijación de nitrógeno en cepas de este género aisladas de la rizósfera, incluyendo especies como *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. firmus* [32].

Esta mayor capacidad de fijar nitrógeno para *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* es consistente con investigaciones previas, ya que se ha identificado la presencia del gen *nifH* en estas especies, lo cual sugiere que pueden catalizar la reducción de nitrógeno al codificar la dinitrogenasa reductasa [70] [71]. La actividad de la enzima nitrogenasa en diferentes especies del género *Bacillus* ha sido evaluada mediante el método de reducción de acetileno, que permite medir la producción de etileno como un indicador de la capacidad fijadora de nitrógeno [104]. Con esta metodología, se ha identificado que especies del género *Bacillus*, como *B. megaterium* y *B. flexus*, pueden alcanzar valores para la actividad de la nitrogenasa de hasta 210.05 ± 7.0 nmol C₂H₄/mg proteína/día, siendo valores superiores en comparación con otras especies bacterianas. En particular, *Bacillus cereus* también ha registrado una actividad nitrogenasa destacada, con valores de 94.52 ± 4.99 nmol C₂H₄/mg proteína/día [109]. En el estudio de Kaushal y Kaushal [48], *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* mostraron una actividad máxima de nitrogenasa de 437.26 y 418.45 nmol C₂H₄/mg proteína/día. Debido a esta máxima actividad, *Bacillus pumilus* fue incorporado como biofertilizante en el estudio. Los resultados demostraron que el uso de esta cepa en combinación con un 75 % de la dosis recomendada de fertilizantes nitrogenados y fosfatados, aumentó el rendimiento del cultivo

de coliflor en un 27.29 %, en comparación con la aplicación completa de fertilizantes químicos. Por lo que la incorporación de diversas especies del género *Bacillus* como biofertilizantes puede promover un manejo agrícola más sostenible, ya que se estaría reduciendo la dependencia del uso de fertilizantes químicos al aprovechar la capacidad fijadora de nitrógeno de estas bacterias.

La capacidad fijadora de nitrógeno para la cepa *Bacillus paramycoides* se relaciona con lo investigado por Apaza y colaboradores [8], quienes identificaron genes en su genoma implicados en la asimilación de amoníaco (*glnR*, *glnA* y *gltB*) y genes relacionados con la denitrificación aeróbica, tales como *narG*, *narH*, *narJ*, y *narI*. La presencia de estos genes indica una mayor flexibilidad y capacidad para utilizar diversas fuentes de nitrógeno. Nafisah y colaboradores [70] en su estudio comparativo con distintos aislados de bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno encontraron que *B. paramycoides* destacó como la cepa con la mayor actividad fijadora, al producir 14.46 mg/L de amonio, superando significativamente a otras cepas evaluadas. Este resultado destaca la capacidad de *B. paramycoides* de transformar el nitrógeno en forma de amonio. La combinación de su alta producción de amonio y su habilidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales mediante el aprovechamiento de diversas fuentes de nitrógeno, sugieren que esta cepa cuenta con habilidades prometedoras para su aplicación en la agricultura sostenible.

En el caso de *Pseudomonas* spp., se ha identificado una isla genética de fijación de nitrógeno en la especie *Pseudomonas stutzeri*. La cual contiene 52 genes *nif* establecidos en 11 operones dependientes de NifA- σ^{54} [106]. Las capacidades fijadoras de nitrógeno se encuentran influenciadas por los mecanismos regulatorios, específicamente para la especie *Pseudomonas stutzeri*, se ha estudiado que bajo condiciones de fijación de nitrógeno, existe una regulación positiva de 166 genes relacionados con este proceso. Además, los 11 operones dependientes de NifA- σ^{54} mostraron una expresión hasta 10 veces mayor en comparación de las condiciones normales [84]. Aunque *Bacillus* cuente con una menor cantidad de genes *nif* a comparación de *Pseudomonas stutzeri*, las cepas *B. paramycoides*, *B. subtilis*, y *B. cereus* presentaron una mejor capacidad de fijar nitrógeno. Lo cual puede estar relacionado con la capacidad de *Bacillus* para utilizar diversas formas de nitrógeno disponible en el entorno, como el amoníaco y en los nitratos, lo cual permiten una mayor flexibilidad en cuanto al uso de fuentes de nitrógeno [7]. En cuanto a la capacidad fijadora de nitrógeno para la cepa *Burkholderia cepacia*, esta habilidad se relaciona con lo investigado por Zheng y colaboradores [53], quienes identificaron genes relacionados con la fijación de nitrógeno, incluyendo *nifQ*, *nifU*, *nfeD*, *fixA*, *fixB*, *fixJ* y *fixX*. La presencia de estos genes en *B. cepacia* concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que respaldan su capacidad para fijar nitrógeno de manera eficiente.

En las figuras 7.3 y 7.4, se observan las curvas de crecimiento bacteriano en caldo LB y en el medio libre de nitrógeno (NFb). Estas curvas se realizaron para estudiar el comportamiento de crecimiento de la población microbiana en distintos medios de cultivo e identificar el inicio de la fase de crecimiento exponencial. En el caldo LB, el inicio de esta fase fue aproximadamente a los 80 minutos, mientras que en el medio NFb el inicio de esta fase se observó luego de 300 minutos. Esta diferencia se debe a que el caldo LB es un medio rico en nutrientes, el cual es ampliamente utilizado ya que permite un crecimiento rápido y con rendimientos aceptables en distintas especies bacterianas [61]. En cambio, el medio NFb al estar elaborado con ausencia de una fuente de nitrógeno accesible, provocó un alargamiento en el tiempo de espera para llegar al inicio de la fase exponencial. Este retraso en el crecimiento puede explicarse debido a que la fijación de nitrógeno es un proceso altamente demandante en términos de energía [62]. La enzima nitrogenasa, la cual es responsable de convertir nitrógeno atmosférico en amoníaco, consume al menos 16 moles de ATP. Por lo que en ausencia de nitrógeno accesible en el medio, las bacterias invierten este alto costo energético en la activación de la enzima [63]. A pesar que el caldo LB proporciona condiciones óptimas para un rápido crecimiento, el uso del medio NFb permite aislar bacterias fijadoras de nitrógeno. Este proceso de selección es posible debido a la ausencia de una fuente de nitrógeno, lo que induce la movilización de las bacterias por aerotaxis hacia áreas donde la tasa de difusión de oxígeno y la respiración bacteriana favorecen la actividad la enzima nitrogenasa, permitiendo la fijación de nitrógeno atmosférico [30].

El objetivo de identificar la fase exponencial en la curva de crecimiento es debido a que en esta fase las células bacterianas muestran una mayor sensibilidad a la radiación UV, a comparación de la fase estacionaria [66]. Por esta razón, los mutantes generados fueron irradiados en su fase exponencial de crecimiento. En cuanto a la cuantificación de nitrógeno fijado por las colonias mutantes, todas las mutantes generadas para

Pseudomonas baetica (1AB27), *Bacillus subtilis* (2MO12) y *Bacillus cereus* (4AP9) presentaron un aumento significativo en sus capacidades de fijar nitrógeno, evidenciada por diferencias estadísticamente significativas en las medias de concentración de nitrógeno fijado antes y después de la exposición a radiación UV. Para las demás cepas, en este caso *B. paramycooides* (1BP10) y *B. cereus* (2AP10) se identificaron colonias individuales con mejoras notables en su capacidad de fijar nitrógeno, como se aprecia en la Figura 7.5-7.7. De las colonias individuales, la colonia 22 de *P. baetica*, mostró la mayor diferencia entre las capacidades de fijación de nitrógeno de la colonia mutada y la colonia control, con una diferencia de 63.34 µg/ml. La colonia 12 para *B. cereus*, fue la que presentó la menor diferencia en su capacidad de fijar nitrógeno a comparación de la colonia control, con una diferencia de 29.53 µg/ml (ver Figura 7.11).

La variabilidad en la diferencia de la capacidad de fijar nitrógeno entre las distintas cepas mutadas puede establecerse en la capacidad de cada cepa bacteriana de reparar las mutaciones inducidas. Masepohl y colaboradores [63], han identificado en *Pseudomonas aeruginosa* que 10 factores sexuales FP evaluados brindan protección contra la radiación UV. De estos, los factores FP50 y FP58, junto con el factor R931, también se encuentran asociados con la protección UV. Los mecanismos de reparación para *Bacillus subtilis*, específicamente en sus esporas, incluyen una capa protectora de la spora y sus pigmentos, proteínas pequeñas ácidas solubles tipo α , que estabilizan el ADN. Además, cuentan con rutas de reparación especializadas como la escisión de nucleótidos (NER), escisión de bases (BER), reparación de productos específicos de esporas (SP) mediante SP liasa [35]. Además, la respuesta SOS, la cual comprende una serie de reacciones fisiológicas inducidas por el daño en el ADN, tiene un rol fundamental en la reparación celular en *B. subtilis*, de manera similar a *E. coli* [105]. Esta respuesta se encuentra regulada por las proteínas LexA (DinR) y RecA [108]. A diferencia de *E. coli*, donde se han identificado más de 30 genes SOS, en *B. subtilis* solo cinco genes cumplen con los criterios de respuesta SOS: *recA*, *lexA*, *uvrB*, *dinB* y *dinC* [80] [58], [10]. Se plantea que *Bacillus* cuenta con una mayor habilidad de reparación celular ante las mutaciones inducidas por la radiación UV, a comparación de *Pseudomonas*, debido a que la colonia 22 de *P. baetica*, mostró la mayor diferencia entre las capacidades de fijación de nitrógeno de la colonia mutada y la colonia control.

Debido a que las colonias mutadas presentaron una capacidad fijadora de nitrógeno significativamente diferente a la colonia no mutada para cada cepa, se puede establecer que las mutaciones no fueron reparadas al momento de cuantificar el nitrógeno fijado. Un factor a considerar que contribuyó en la inhibición de las rutas de reparación de ADN fue que las muestras fueron protegidas ante la exposición de luz directa luego de la radiación con UV. Esta protección interfiere con la activación de la enzima fotoliasa, la cual es la encargada de reparar los daños en el ADN provocados por la irradiación, específicamente los dímeros de pirimidinas ciclobutánicas (CPD) y los fotoproductos pirimidina-pirimidona [49]. Para comprender a detalle el efecto de la radiación UV en el mejoramiento de la capacidad de fijar nitrógeno de cada cepa es necesario realizar una secuenciación de los genes *nif*. Donde el gen *nifH* es considerado un marcador ideal para la identificación de microorganismos fijadores de nitrógeno [54].

No fue posible generar mutantes de la cepa *Burkholderia cepacia*, lo que sugiere que la ausencia de colonias sobrevivientes podría haber sido resultado de una dosis de radiación superior a la óptima para esta cepa. El factor de la dosimetría es una limitante en este estudio, ya que se desconoce el nivel de radiación generado por la cámara UVGi P001 marca Serproma. Cairns y colaboradores [18], establecieron que ninguna cepa sobrevive exposiciones superiores a 8 segundos bajo una fuente de 7.2 W de UVGI, donde lograron una reducción de 1 log en el número de bacterias utilizando un rango de radiación de 28.3 a 57.5 J/m² ± 2. Por lo tanto, se podría utilizar una dosis dentro de este rango (28.3 a 57.5 J/m² ± 2) para lograr generar colonias mutantes de *Burkholderia cepacia*. Para lograr esto, se podría intentar utilizar la luz ultravioleta disponible en las cabinas de flujo laminar. Lo que destaca la importancia de conocer la dosimetría generada por la cámara para poder ajustar la intensidad y el tiempo de exposición de manera óptima, permitiendo el crecimiento de esta cepa. Debido a que no fue posible evaluar el cambio en la capacidad fijadora de nitrógeno para *B. cepacia*, solamente se logró evaluar el cambio a una bacteria Gram negativa. Se recomienda evaluar el efecto de la radiación UV en otras bacterias Gram negativas, con el objetivo de estudiar el efecto de la irradiación en la capacidad de fijar nitrógeno tomando en consideración diferencias estructurales entre Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas generalmente son más resistentes a la radiación UV en comparación con las bacterias Gram negativas, lo cual fue demostrado en el estudio de Beauchamp y colaboradores [13] que determinaron que *Listeria monocytogenes* produjo menos CPD y fotoproductos pirimidina-pirimidona

(6-4) a comparación de *Escherichia coli*.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda la utilización de las colonias mutadas con la mayor capacidad de fijación de nitrógeno para aplicaciones biotecnológicas y agrícolas. En particular, la colonia 22 de *Pseudomonas baetica* (1AB27), mostró la mayor diferencia en la capacidad de fijación de nitrógeno entre la colonia mutada y su colonia control, alcanzando una diferencia de 63.34 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo, se podría implementar el uso de la colonia 3 de *Bacillus cereus*, y la colonia 5 de *Bacillus subtilis*, al obtener diferencias en la media de fijación entre la colonia mutada y su colonia control de 41.91 $\mu\text{g/ml}$ y 41.43 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados sugieren que estas colonias mutadas podrían ser candidatos para su desarrollo como biofertilizantes para caña de azúcar, dado su potencial para aumentar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. En muchos cultivos como la caña de azúcar, donde la demanda de nitrógeno es elevada, el uso de biofertilizantes puede resultar en una reducción significativa en la necesidad de fertilizantes químicos, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y económicas [73]. En investigaciones futuras, sería necesario desarrollar formulaciones combinando las colonias mutadas de las distintas cepas con material adecuado para garantizar estabilidad y viabilidad durante distintos procesos, como almacenamiento y aplicación en campo [39]. Antes de llevar las formulaciones al campo, es fundamental realizar pruebas en condiciones controladas dentro del laboratorio utilizando plantas para evaluar su efectividad en términos de fijación de nitrógeno, crecimiento de las plantas y resistencia a condiciones ambientales [101].

Conclusiones

1. Fue posible realizar una mutagénesis aleatoria con radiación UV a 425nm de cepas con capacidad de fijar nitrógeno.
2. Se cuantificó el nitrógeno fijado por bacterias diazotróficas, empleando un método espectrofotométrico.
3. Se identificó que cepas *Bacillus paramycoides* (1BP10), *Bacillus subtilis* (2MO12), y *Bacillus cereus* (4AP9) mostraron una diferencias significativas entre sus medias de la concentración de nitrógeno fijada en comparación con otras las otras cepas.
4. Se elaboraron las distintas curvas de crecimiento bacteriano previo al proceso de mutagénesis aleatoria.
5. Se determinó que la fase exponencial utilizando caldo LB inicio aproximadamente a los 80 minutos, mientras que en el medio NFb inició luego de 300 minutos.
6. Se identificó que todas las colonias mutantes generadas para *Pseudomonas baetica*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus cereus* presentaron una mejorar en sus capacidades de fijar nitrógeno.
7. La colonia 22 de *Pseudomonas baetica*, mostró la mayor diferencia entre las capacidades de fijación de nitrógeno entre la colonia mutada y la colonia control.
8. Se elaboró un cepario de las bacterias diazotróficas que presentaron una mejorar en la capacidad fijadora de nitrógeno, luego del proceso de mutagénesis aleatoria.

Recomendaciones

1. Secuenciar los genes *nif* de las colonias mutadas que presentaron una mejora en la capacidad fijadora de nitrógeno, para establecer el efecto de las mutaciones inducidas por la radiación UV. De igual manera, se recomienda la secuenciación de genoma completo para la identificación de mutaciones que puedan haber afectado promotores o represores.
2. Incluir otras especies Gram negativo en el proceso de mutagénesis aleatoria, específicamente bacterias del género *Klebsiella*, con el objetivo de estudiar el efecto de la irradiación tomando en consideración diferencias estructurales entre Gram positivas y Gram negativo.
3. Evaluar el efecto de la enzima fotoliasa al exponer las colonias mutantes ante luz directa luego del proceso de irradiación.
4. Establecer la dosis exacta de radiación generada por la cámara UVGi P001 de la marca Serproma, para optimizar la intensidad y tiempo de exposición para la cepa *Burkholderia cepacia*.
5. Se recomienda la utilización de las colonias mutadas con la mayor capacidad de fijación de nitrógeno para su futura aplicación como biofertilizantes. En particular, la colonia 22 de *Pseudomonas baetica* (1AB27), colonia 3 de *Bacillus cereus*, y la colonia 5 de *Bacillus subtilis*.

- [1] Abedi-Moghaddam, NASIM, A Bulic, L Herderson y ELAINE Lam: *Survival of Escherichia coli to UV irradiation during exponential and stationary phases of growth*. J. Exp. Microbiol. Immunol, 5:44–49, 2004.
- [2] Agosto, Say y Andrés De Jesús: *Caracterización genómica y desarrollo de un sistema de edición génica a través de CRISPR/Cas9 de bacterias promotoras del crecimiento de plantas aisladas de Saccharum oflicinarum para una mejora en la fijación de nitrógeno*. 2023.
- [3] Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la: *El mercado mundial de fertilizantes: balance de la situación de un mercado en dificultades*. 2022.
- [4] Al-Khayri, Jameel M, S Mohan Jain y Dennis Victor Johnson: *Advances in plant breeding strategies: Industrial and food crops*. Springer, 2019.
- [5] Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y Peter Walter: *From DNA to RNA*. En *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science, 2002.
- [6] Andrade, Luana Alves de, Carlos Henrique Barbosa Santos, Edvan Teciano Frezarin, Luziane Ramos Sales y Everlon Cid Rigobelo: *Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production*. Microorganisms, 11(4):1088, 2023.
- [7] Antunes, Jadson Emanuel Lopes, MCCP Lyra, Francisco Javier Ollero Márquez, Ana Dolores Santiago De Freitas, LMS Oliveira, ASF Araújo y Márcia Do Vale Barreto Figueiredo: *Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane*. Genetics and Molecular Research, 16 (2), gmr16029662-, 2017.

- [8] Apaza-Castillo, Gladys Angélica, Guilherme Kenichi Hosaka y Maria Carolina Quecine: *Genome insights from the Amazonian rhizobacterium Bacillus paramycoides RZ3MS14 reveal plant growth-promoting multi-traits and bioprotection against phytopathogens and environmental stresses*. 2022.
- [9] Armada, E, G Portela, A Roldán y R Azcón: *Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions*. *Geoderma*, 232:640–648, 2014.
- [10] Au, Nora, Elke Kuester-Schoeck, Veena Mandava, Laura E Bothwell, Susan P Canny, Karen Chachu, Sierra A Colavito, Shakierah N Fuller, Eli S Groban, Laura A Hensley y cols.: *Genetic composition of the Bacillus subtilis SOS system*. *Journal of bacteriology*, 187(22):7655–7666, 2005.
- [11] Azúcar)., CONADESUCA (Comité Nacional para el Desarrollo sustentable de la Caña de: *Ficha técnica del cultivo de la caña de azúcar (Saccharum oflcinarum L.)*, 2015.
- [12] Barro, Francisco, Juan Fernández-Escobar, Mercedes De la Vega y Antonio Martín: *Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of Brassica carinata by UV treatment of isolated microspores*. *Euphytica*, 129:1–6, 2003.
- [13] Beauchamp, Stéphane y Monique Lacroix: *Resistance of the genome of Escherichia coli and Listeria monocytogenes to irradiation evaluated by the induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts using gamma and UV-C radiations*. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(8):1193–1197, 2012.
- [14] Beig, Bilal, Muhammad Bilal Khan Niazi, Zaib Jahan, Erum Pervaiz, Ghulam Abbas Shah, Midrar Ul Haq, Mazhar Iqbal Zafar y Munir Zia: *Slow-release urea prills developed using organic and inorganic blends in fluidized bed coater and their effect on spinach productivity*. *Sustainability*, 12(15):5944, 2020.
- [15] Bose, Jeffrey L: *Chemical and UV mutagenesis*. *The Genetic Manipulation of Staphylococci: Methods and Protocols*, páginas 111–115, 2016.
- [16] Bottomley, Peter J y David D Myrold: *Biological N inputs*. En *Soil microbiology, ecology and biochemistry*, páginas 365–387. Elsevier, 2007.
- [17] Breuer, Guido, Lenny de Jaeger, Valentin P G Artus, Dirk E Martens, Jan Springer, René B Draaisma, Gerrit Eggink, René H Wijffels y Packo P Lamers: *Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of Scenedesmus obliquus:(II) evaluation of TAG yield and productivity in controlled photobioreactors*. *Biotechnology for biofuels*, 7:1–11, 2014.
- [18] Cairns, G, KG Kerr, CB Beggs, PA Sleigh, L Mooney, P Keig y JK Donnelly: *Susceptibility of Burkholderia cepacia and other pathogens of importance in cystic fibrosis to uv light*. *Letters in applied microbiology*, 32(3):135–138, 2001.
- [19] Cassman, Kenneth G, Achim Dobermann y Daniel T Walters: *Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management*. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2):132–140, 2002.
- [20] Chatterjee, Nimrat y Graham C Walker: *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5):235–263, 2017.
- [21] Christiansen-Weniger, C y JA Van Veen: *NH₄⁺-excreting Azospirillum brasilense mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10):3006–3012, 1991.

- [22] Cid Villatoro, Julio David del: *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*. 2022.
- [23] Consilla Donaire, Milagros, Joaquín Arias Segura y Daniel Rodríguez Sáenz: *Aumenta 137 el valor de las importaciones de fertilizantes químicos de América Latina y el Caribe en 2022*. Blog IICA, 2022.
- [24] Cooper, Geoffrey M y Donald Ganem: *The cell: a molecular approach*. Nature Medicine, 3(9):1042–1042, 1997.
- [25] Cordova-Rodriguez, A, ME Rentería-Martínez, CA López-Miranda, JM Guzmán-Ortíz y SF Moreno-Salazar: *Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures*. MethodsX, 9:101917, 2022.
- [26] Cultivos, Coordinadora Interinstitucional Sistema de Monitoreo de: *Informe del Sistema de Monitoreo de Cultivos*. Blog IICA, 2023.
- [27] Dadi, Murali, Mohd Yasir, M Dadi y M Yasir: *Spectroscopy and Spectrophotometry: principles and applications for colorimetric and related other analysis*. Colorimetry, 1:81–102, 2022.
- [28] Daniel, Augustine Innalegwu, Adewale Oluwaseun Fadaka, Arun Gokul, Olalekan Olanrewaju Bakare, Omolola Aina, Stacey Fisher, Adam Frank Burt, Vuyo Mavumengwana, Marshall Keyster y Ashwil Klein: *Biofertilizer: the future of food security and food safety*. Microorganisms, 10(6):1220, 2022.
- [29] Desalegn, Belete, Erana Kebede, Hirpa Legesse y Tarekegn Fite: *Sugarcane productivity and sugar yield improvement: Selecting variety, nitrogen fertilizer rate, and bioregulator as a first-line treatment*. Heliyon, 9(4), 2023.
- [30] Di Salvo, Luciana P y Inés E García de Salamone: *Desarrollo de película típica en medio Nfb semisólido por Azospirillum brasilense*. Revista argentina de microbiología, 51(2):184–185, 2019.
- [31] Dinesh Babu, Kandhalu Sagadevan, Vardhana Janakiraman, Harunipriya Palaniswamy, Lakshmi Kasi- rajan, Raju Gomathi y Thakku R Ramkumar: *A short review on sugarcane: its domestication, molecular manipulations and future perspectives*. Genetic Resources and Crop Evolution, 69(8):2623–2643, 2022.
- [32] Ding, Y, J Wang, Y Liu y S Chen: *Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region*. Journal of applied microbiology, 99(5):1271–1281, 2005.
- [33] Dixon, Ray y Daniel Kahn: *Genetic regulation of biological nitrogen fixation*. Nature Reviews Micro- biology, 2(8):621–631, 2004.
- [34] Dixon, Ray A y John R Postgate: *Genetic transfer of nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli*. Nature, 237(5350):102–103, 1972.
- [35] Djouiaï, Bahar, Joanne E Thwaite, Thomas R Laws, Fabian M Commichau, Barbara Setlow, Peter Setlow y Ralf Moeller: *Role of DNA repair and protective components in Bacillus subtilis spore resistance to inactivation by 400-nm-wavelength blue light*. Applied and environmental microbiology, 84(19):e01604–18, 2018.
- [36] Dlamini, Philani Justice: *Drought stress tolerance mechanisms and breeding effort in sugarcane: A review of progress and constraints in South Africa*. Plant Stress, 2:100027, 2021.
- [37] Extensión Agrícolas, Costa Rica. Dirección General de Investigación y: *Aspectos técnicos sobre cua- renta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica*. La Dirección, 1991. [https://books.google.com. gt/books?id=YDxgAAAAMAAJ](https://books.google.com.gt/books?id=YDxgAAAAMAAJ).
- [38] Fernandes, Antonio Carlos: *Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar*, volumen 1. Stab, 2003.
- [39] Glick, Bernard R: *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica, 2012(1):963401, 2012.

- [40] González-Púmariega, Maribel, Marioly Vernhes Tamayo y Ángel Sánchez-Lamar: *La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana*. Theoria, 18(2):69–80, 2009.
- [41] Goosen, Nora y Geri F Moolenaar: *Repair of UV damage in bacteria*. DNA repair, 7(3):353–379, 2008.
- [42] Guatemala, Asociación Bancaria de: *SECTOR AZUCARERO*. 2022. <https://abg.org.gt/es/wp-content/uploads/2022/08/SECTOR-2-AZUCAR-JUNIO-2022.pdf>.
- [43] Guo, Kaiyan, Jun Yang, Nan Yu, Li Luo y Ertao Wang: *Biological nitrogen fixation in cereal crops: Progress, strategies, and perspectives*. Plant Communications, 4(2), 2023.
- [44] Huang, Zhi, Shuting Ruan, Yangyang Sun, Xiaoyue Cheng, Jinghui Dai, Peng Gui, Mingjun Yu, Zengtao Zhong y Juyou Wu: *Bacterial inoculants improved the growth and nitrogen use efficiency of *Pyrus betulifolia* under nitrogen-limited conditions by affecting the native soil bacterial communities*. Applied Soil Ecology, 170:104285, 2022.
- [45] Ji, Kim, Lee: *Enhancement of vitality and activity of a plant growth-promoting bacteria (PGPB) by atmospheric pressure non-thermal plasma*. Sci Rep 9(1044), 2019.
- [46] Johnson, Anne, Kara Laney, Engineering National Academies of Sciences, Medicine, Environmental Health Matters Initiative y cols.: *Reducing the health impacts of the nitrogen problem*. Blog IICA, 2021.
- [47] Kanakdande, Amruta Prakash, Chandrasahya Namdev Khobragade y Rajaram Sakharan Mane: *Ultra-violet induced random mutagenesis in *Bacillus amyloliquefaciens* (MF 510169) for improving biodiesel production*. Fuel, 304:121380, 2021.
- [48] Kaushal, Manoj y Rajesh Kaushal: *Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system*. Indian Journal of Biotechnology, 14(2):221–227, 2015.
- [49] Kavakli, Ibrahim Halil, Nuri Ozturk y Seref Gul: *DNA repair by photolyases*. Advances in protein chemistry and structural biology, 115:1–19, 2019.
- [50] Ke, Xiubin, Shuai Feng, Jin Wang, Wei Lu, Wei Zhang, Ming Chen y Min Lin: *Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere*. Systematic and Applied Microbiology, 42(2):248–260, 2019.
- [51] Kuan, Khing Boon, Radziah Othman, Khairuddin Abdul Rahim y Zulkifli H Shamsuddin: *Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions*. PloS one, 11(3):e0152478, 2016.
- [52] Labrou, Nikolaos E: *Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution*. Current Protein and Peptide Science, 11(1):91–100, 2010.
- [53] Li, Zheng, Ahmed R Henawy, Asmaa A Halema, Qiuling Fan, Deqiang Duanmu y Renliang Huang: *A wild rice rhizobacterium *Burkholderia cepacia* BRDJ enhances nitrogen use efficiency in rice*. International Journal of Molecular Sciences, 23(18):10769, 2022.
- [54] Lin, Biaosheng, Jiamin Liu, Xue Zhang, Changren Weng y Zhanxi Lin: *The Flora Compositions of Nitrogen-Fixing Bacteria and the Differential Expression of *nifH* Gene in *Pennisetum giganteum* zx lin Roots*. BioMed Research International, 2021(1):5568845, 2021.
- [55] Lin, Yaru, Dexter B Watts, Joseph W Kloepper, Anthony O Adesemoye, Yucheng Feng y cols.: *Effect of plant growth-promoting rhizobacteria at various nitrogen rates on corn growth*. Agricultural Sciences, 10(12):1542, 2019.
- [56] Loewe, Laurence y William G Hill: *The population genetics of mutations: good, bad and indifferent*, 2010.

- [57] Lopes, Monyck Jeane dos Santos, Moacyr Bernardino Dias-Filho y Ely Simone Cajueiro Gurgel: *Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5:606454, 2021.
- [58] Lovett, Ch M y Jeffrey W Roberts: *Purification of a RecA protein analogue from Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6):3305–3313, 1985.
- [59] Lu, Feng, Jiapin Chao, Xiaoxue Zhao, Garba Betchem, Yanhua Ding, Xue Yang, Yunliang Li y Haile Ma: *Enhancing protease activity of Bacillus subtilis using UV-laser random mutagenesis and high-throughput screening*. *Process Biochemistry*, 119:119–127, 2022.
- [60] Macdonald Miller, Sean, Raffaella M Abbriano, Andrei Herdean, Richard Banati, Peter J Ralph y Mathieu Pernice: *Random mutagenesis of Phaeodactylum tricorutum using ultraviolet, chemical, and X-ray irradiation demonstrates the need for temporal analysis of phenotype stability*. *Scientific Reports*, 13(1):22385, 2023.
- [61] MacWilliams, Maria P y Min K Liao: *Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol*. ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology, 2006:1–4, 2006.
- [62] Maier, Robert J: *Chapter 5: Nitrogen fixation and respiration: two processes linked by the energetic demands of nitrogenase*. En *Respiration in Archaea and Bacteria: Diversity of Prokaryotic Respiratory Systems*, páginas 101–120. Springer, 2004.
- [63] Masepohl, B, K Schneider, T Drepper, A Müller y W Klipp: *Alternative nitrogenases*. *Nitrogen fixation at the millennium*, páginas 191–222, 2002.
- [64] Mehnaz, Samina: *Plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane*. En *Bacteria in agrobiology: crop ecosystems*, páginas 165–187. Springer, 2011.
- [65] Melgar, Mario, Adlai Meneses, Héctor Orozco, Ovidio Pérez y Rodolfo Espinosa: *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. CENGICANÁ, Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de . . . , 2012.
- [66] Mendonça, AF y A Daraba: *Non-Thermal Processing/ Irradiation*. 2014.
- [67] Mercadante, AA, M Dimri y SS Mohiuddin: *Biochemistry, Replication and Transcription.[Updated 2020 Aug 28]*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- [68] Mus, Florence, Alexander B Alleman, Natasha Pence, Lance C Seefeldt y John W Peters: *Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation*. *Metallomics*, 10(4):523–538, 2018.
- [69] Muthukumarasamy, Ramachandran, Gopalakrishnan Revathi, Muthiayan Vadivelu y Kannan Arun: *Isolation of bacterial strains possessing nitrogen-fixation, phosphate and potassium-solubilization and their inoculation effects on sugarcane*. 2017.
- [70] Nafisah, Wardatun, Sitoresmi Prabaningtyas, Agung Witjoro, Rina Triturani Saptawati y Achmad Roldiansyah: *Exploration non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria from several lakes in East Java, Indonesia*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(4), 2022.
- [71] Narayanan, Mathiyazhagan, Arivalagan Pugazhendhi y Ying Ma: *Assessment of PGP traits of Bacillus cereus NDRMN001 and its influence on Cajanus cajan (L.) Millsp. phytoremediation potential on metal-polluted soil under controlled conditions*. *Frontiers in Plant Science*, 13:1017043, 2022.
- [72] Nosheen, Shaista, Iqra Ajmal y Yuanda Song: *Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production*. *Sustainability*, 13(4):1868, 2021.
- [73] Ohyama, Takuji, Atsushi Momose, Norikuni Ohtake, Kuni Sueyoshi, Takashi Sato, Yasuhiro Nakanishi y Shoichiro Akao: *Nitrogen Fixation and Translocation in Sugarcane*. *Nature precedings*, páginas 1–1, 2008.

- [74] Olanrewaju, Oluwaseyi Samuel, Bernard R Glick y Olubukola Oluranti Babalola: *Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33:1–16, 2017.
- [75] Pardo Díaz, Sergio, Diana Carolina Mazo Molina y Daniel Fernando Rojas Tapias: *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: filogenia, microbioma, y perspectivas*.
- [76] Passos, Marieta LC y M Lúcia MFS Saraiva: *Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies*. Measurement, 135:896–904, 2019.
- [77] Potijun, Supakorn, Suparat Jaingam, Nuttha Sanevas, Srunya Vajrodaya y Anchalee Sirikhachornkit: *Green microalgae strain improvement for the production of sterols and squalene*. Plants, 10(8):1673, 2021.
- [78] Rabelo, Sarita Cândida, Lívia Beatriz Brenelli de Paiva, Thaynara Coradini Pin, Luisa Fernanda Rios Pinto, Laura Plazas Tovar y Pedro Yoritomo Souza Nakasu: *Chemical and energy potential of sugarcane. En Sugarcane biorefinery, technology and perspectives*, páginas 141–163. Elsevier, 2020.
- [79] Ramos, Luan, Elisete Rodrigues, Mayara Silva, Jessica Oliveira, Mónica Yorlady Alzate Zuluaga, Karina Milani y Andre Luiz Oliveira: *Ammonium excretion, auxin production and effects of maize inoculation with ethylenediamine-resistant mutants of Pseudomonas sp.* Bragantia, 77, Agosto 2018.
- [80] Raymond-Denise, Agnès y Nancy Guillen: *Identification of dinR, a DNA damage-inducible regulator gene of Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 173(22):7084–7091, 1991.
- [81] Rilling, JI, JJ Acuña, P Nannipieri, F Cassan, F Maruyama y MA Jorquera: *Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria*. Soil Biology and Biochemistry, 130:205–219, 2019.
- [82] Roley, Sarah S, David S Duncan, Di Liang, Aaron Garoutte, Randall D Jackson, James M Tiedje y G Philip Robertson: *Associative nitrogen fixation (ANF) in switchgrass (Panicum virgatum) across a nitrogen input gradient*. PloS one, 13(6):e0197320, 2018.
- [83] Rosa, Poliana Aparecida Leonel, Emariane Satin Mortinho, Arshad Jalal, Fernando Shintate Galindo, Salatiér Buzetti, Guilherme Carlos Fernandes, Maurício Barco Neto, Paulo Sergio Pavinato y Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho: *Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane*. Frontiers in Environmental Science, 8:32, 2020.
- [84] Sanow, Stefan, Weiqi Kuang, Gabriel Schaaf, Pitter Huesgen, Ulrich Schurr, Ute Roessner, Michelle Watt y Borjana Arsova: *Molecular mechanisms of Pseudomonas-assisted plant nitrogen uptake: Opportunities for modern agriculture*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 36(9):536–548, 2023.
- [85] Santos, Roberta M, Saveetha Kandasamy y Everlon Cid Rigobelo: *Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste*. MicrobiologyOpen, 7(6):e00617, 2018.
- [86] Sarayloo, Ehsan, Salim Simsek, Yigit Sabri Unlu, Gul Cevahir, Can Erkey y Ibrahim Halil Kavakli: *Enhancement of the lipid productivity and fatty acid methyl ester profile of Chlorella vulgaris by two rounds of mutagenesis*. Bioresource technology, 250:764–769, 2018.
- [87] Schatan, Claudia y Marcos Avalos: *Condiciones de competencia en el contexto internacional: cemento, azúcar y fertilizantes en Centroamérica*. 2006.
- [88] Schroeder, Jeremy W, Ponkrit Yeesin, Lyle A Simmons y Jue D Wang: *Sources of spontaneous mutagenesis in bacteria*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 53(1):29–48, 2018.
- [89] Setten, Lorena, Gabriela Soto, Matteo Mozzicafreddo, Ana Romina Fox, Christian Lisi, Massimiliano Cuccioloni, Mauro Angeletti, Elba Pagano, Antonio Díaz-Paleo y Nicolás Daniel Ayub: *Engineering Pseudomonas protegens Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions*. Plos one, 8(5):e63666, 2013.

- [90] Shahid, Muhammad, Muhammad Usman, Tanvir Shahzad, Iftikhar Ali, Muhammad Umair Hassan, Faisal Mahmood y Sameer H Qari: *Enhancement of Wheat Growth by UV-Mutagenesis of Potential Chromium Tolerant Bacillus sp. Strain SR-2-1/1*. Sustainability, 14(22):15341, 2022.
- [91] Shibai, Atsushi, Yusuke Takahashi, Yuka Ishizawa, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Bei Wen Ying y Saburo Tsuru: *Mutation accumulation under UV radiation in Escherichia coli*. Scientific reports, 7(1):14531, 2017.
- [92] Singh, Pratiksha, Rajesh Kumar Singh, Hai Bi Li, Dao Jun Guo, Anjney Sharma, Krishan K Verma, Manoj Kumar Solanki, Sudhir K Upadhyay, Prakash Lakshmanan, Li Tao Yang y cols.: *Nitrogen fixation and phytohormone stimulation of sugarcane plant through plant growth promoting diazotrophic Pseudomonas*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 40(1):15–35, 2024.
- [93] Sirotkin, Karl: *Advantages to mutagenesis techniques generating populations containing the complete spectrum of single codon changes*. Journal of theoretical biology, 123(3):261–279, 1986.
- [94] Soumare, Abdoulaye, Abdala G Diedhiou, Moses Thuita, Mohamed Hafidi, Yedir Ouhdouch, Subramaniam Gopalakrishnan y Lamfeddal Kouisni: *Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture*. Plants, 9(8):1011, 2020.
- [95] Supervisión, Departamento de Análisis Macroprudencial y Estándares de: *SECTOR AZUCARE-RO*. 2016. https://www.sib.gob.gt/c/document_library/get_file?folderId=3789510&name=DLFE-26739.pdf.
- [96] Swamy, C.: *The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) in Soil Fertility Restoration in Chemical Contaminated Areas*. Qeios, 2023.
- [97] Tobías, Hugo y E Lira: *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA)*. Primera Aproximación al Mapa de Clasificación Taxonómica de los Suelos de la República de Guatemala, a escala, 1:44, 2000.
- [98] Toppa, Eder, Cleber Jadoski, Alessandra Julianetti, Tarcisio Hulshof y Elizabeth Ono: *Physiology aspects of sugarcane production*. 3, Septiembre 2011.
- [99] Trovão, Mafalda, Lisa M Schüler, Adriana Machado, Gabriel Bombo, Sofia Navalho, Ana Barros, Hugo Pereira, Joana Silva, Filomena Freitas y João Varela: *Random mutagenesis as a promising tool for microalgal strain improvement towards industrial production*. Marine drugs, 20(7):440, 2022.
- [100] Vejan, Pravin, Rosazlin Abdullah, Tumirah Khadiran, Salmah Ismail y Amru Nasrulloq Boyce: *Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review*. Molecules, 21(5):573, 2016.
- [101] Vessey, J Kevin: *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant and soil, 255:571–586, 2003.
- [102] Wang, Fen, Chaoran Wang, Binghao Yang, Xinyu Luo, Gaowei Qi, Fajin Ji, Xinkai Guo, Tao Yang, Xuehui Zhao, Ming Li y cols.: *Nitrogen Application Timing and Levels Affect the Fate and Budget of Fertilizer Nitrogen in the Apple–Soil System*. Plants, 13(6):813, 2024.
- [103] Watanabe, Takashi, Itsuki Watanabe, Mami Yamamoto, Akira Ando y Toshihide Nakamura: *A UV-induced mutant of Pichia stipitis with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance*. Bioresource technology, 102(2):1844–1848, 2011.
- [104] Wilson, Samuel T, Daniela Böttjer, Matthew J Church y David M Karl: *Comparative assessment of nitrogen fixation methodologies, conducted in the oligotrophic North Pacific Ocean*. Applied and environmental microbiology, 78(18):6516–6523, 2012.
- [105] Witkin, Evelyn M: *Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli*. Bacteriological reviews, 40(4):869–907, 1976.

- [106] Yan, Yongliang, Shuzhen Ping, Junping Peng, Yunlei Han, Liang Li, Jian Yang, Yuetan Dou, Yan Li, Huili Fan, Ying Fan y cols.: *Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated Pseudomonas stutzeri A1501*. BMC genomics, 11:1–13, 2010.
- [107] Yang, Linsheng, Yifang Zhou, Bo Meng, Jian Zhan, Min Xi, Yan Deng, Wenge Wu, Prakash Lakshmanan, Xinping Chen y Fusuo Zhang: *High sugarcane yield and large reduction in reactive nitrogen loss can be achieved by lowering nitrogen input*. Agriculture, Ecosystems & Environment, 369:109032, 2024.
- [108] Yasbin, RONALD E: *DNA repair in Bacillus subtilis*. Molecular Biology of the Bacilli, 2:33–52, 1985.
- [109] Yousuf, Jesmi, Jabir Thajudeen, Mujeeb Rahiman, Soumya Krishnankutty, Aneesa P. Alikunj y Mohamed H A. Abdulla: *Nitrogen fixing potential of various heterotrophic Bacillus strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions*. Journal of basic microbiology, 57(11):922–932, 2017.
- [110] Zeng, Xu Peng, Kai Zhu, Jian Ming Lu, Yuan Jiang, Li Tao Yang, Yong Xiu Xing y Yang Rui Li: *Long-term effects of different nitrogen levels on growth, yield, and quality in sugarcane*. Agronomy, 10(3):353, 2020.

12.1. Protocolos

Anexo 12.1: SOP 20 - Página 1

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Método espectrofotométrico para la estimación de la fijación de nitrógeno de bacterias diazotróficas	Autores: Isabella García Caffaro, Josué Castañon

1. Propósito

Realizar una curva de estandarización por medio de espectrofotometría UV/Vis a través del cambio del color de azul de bromotimol, con el fin de estimar la cantidad de nitrógeno fijado durante el crecimiento de bacterias diazotróficas.

2. Aplicación

El nitrógeno es un elemento limitante en la productividad vegetal y su exceso puede conllevar a la aparición de patógenos en los cultivos. Sin embargo, los inoculantes en base a bacterias diazotróficas, constituyen una alternativa eficaz al uso de fertilizantes nitrogenados, debido a su capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico y lo hace disponible para los cultivos (Rodríguez, et al., 2014). Además de eso se ha encontrado que el utilizar bacterias diazotróficas mejora la eficiencia de absorción de nutrientes del suelo, produce y libera fitohormonas al huésped y le confiere resistencia contra patógenos, por medio de asociaciones simbióticas o mutualistas (Pankievicz, et al., 2021).

Las bacterias diazotróficas se han logrado cultivar principalmente en el medio de cultivo semisólido Nfb, el cual es un medio libre de nitrógeno. Dicho medio permite el crecimiento de las bacterias diazotróficas ya que el medio permite que las bacterias se puedan movilizar por aerotaxis a un lugar donde la tasa de difusión de oxígeno y la respiración bacteriana permita que la enzima nitrogenasa fije N_2 (Di Salvo & García, 2019; Di Salvo, et al., 2014). De igual forma a medida que el crecimiento de la bacteria vaya en aumento se va a observar la alcalinización del medio de cultivo mediante un cambio de color, siendo este de verde a azul, debido al colorante redox azul de bromotimol, permitiendo así realizar una estimación del número probable de bacteria beneficiosas para la planta en inoculantes comerciales o el recuento de diazotrofos a partir de muestras ambientales (Di Salvo & García, 2019).

3. Referencias

3.1. Cordova-Rodriguez, A., Rentería-Martínez, M. E., López-Miranda, C. A., Guzmán-Ortíz, J. M., & Moreno-Salazar, S. F. (2022). Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. *MethodsX*, 9, 101917. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101917>

4. Terminología

4.1. Bacterias diazotróficas: Grupo de bacterias que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, produciendo

5. Documentos asociados

- 5.1. Di Salvo, Luciana P., & García de Salamone, Inés E. (2019). Veil-like pellicle development by *Azospirillum brasilense* in semisolid NFB medium. *Revista argentina de microbiología*, 51(2), 184-185. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.002>
- 5.2. Di Salvo, L. P., Silva, E., Teixeira, K. R. S., Cote, R. E., Pereyra, M. A., & García de Salamone, I. E. (2014). Physiological and biochemical characterization of *Azospirillum brasilense* strains commonly used as plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 54(12), 1310–1321. doi:10.1002/jobm.201400135
- 5.3. Germer, T., Zwinkels, J., & Tsai, B. (2014). Introduction. *Experimental Methods In The Physical Sciences*, 1-9. doi: 10.1016/b978-0-12-386022-4.00001-7
- 5.4. Hernández-Rodríguez, Annia, Rives-Rodríguez, Narovis, Acebo-Guerrero, Yanelis, Díaz-de la Osa, Acela, Heydrich-Pérez, Mayra, & Divan Baldani, Vera Lucia. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 1-10. Recuperado en 13 de agosto de 2023, http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000100001&lng=es&tlng=es.
- 5.5. Pankievicz, V., do Amaral, F., Ané, J.-M., & Stacey, G. (2021). Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(5), 491–498. doi:10.1094/mpmi-11-20-0316-fi
- 5.6. Wagner, S. (2011) Biological Nitrogen Fixation. *Nature education Knowledge*, 3(10): 15. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Autoclave
- 7.1.2. potenciómetro
- 7.1.3. Balanza analítica
- 7.1.4. Espectrofotómetro

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos de ensayo
- 7.2.2. Balones aforados
- 7.2.3. Probetas
- 7.2.4. Micropipetas de 1000 y 100µL
- 7.2.5. Puntas P1000 y P100
- 7.2.6. Cubetas para espectrofotómetro

- 7.2.7. Kimewipes
 7.2.8. Erlenmeyer de 500mL
- 7.3. Reactivos**
- 7.3.1. K_2HPO_4
 7.3.2. $MgSO_4$
 7.3.3. NaCl
 7.3.4. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
 7.3.5. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
 7.3.6. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
 7.3.7. H_3BO_3
 7.3.8. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
 7.3.9. $MnSO_4 \cdot H_2O$
 7.3.10. Azul de bromotimol
 7.3.11. KOH
 7.3.12. Fe-EDTA
 7.3.13. Biotina
 7.3.14. piridoxal-HCl
 7.3.15. NH_4OH
 7.3.16. HCl
- 7.4. Medicamentos**
- 7.4.1. No aplica
- 7.5. Material biológico**
- 7.5.1. No aplica
- 8. Procedimiento**
- 8.1. Composición del medio de cultivo
- 8.1.1. La composición del medio líquido NFB para 500mL es la siguiente: $5 \frac{g}{L}$ de ácido málico; $0.5 \frac{g}{L}$ K_2HPO_4 ; $0.2 \frac{g}{L}$ $MgSO_4$; $0.1 \frac{g}{L}$ NaCl; $0.02 \frac{g}{L}$ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; $2 \frac{mL}{L}$ solución de micronutrientes ($0.04 \frac{g}{L}$ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $0.12 \frac{g}{L}$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $1.4 \frac{g}{L}$ H_3BO_3 ; $1.0 \frac{g}{L}$ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y $1.175 \frac{g}{L}$ $MnSO_4 \cdot H_2O$); $2 \frac{mL}{L}$ de azul de bromotimol ($5 \frac{g}{L}$ de azul de bromotimol en KOH 0.2N); $4 \frac{mL}{L}$ de solución de ácido Fe-etilendiaminotetraacético (EDTA) ($16.4 \frac{g}{L}$ Fe-EDTA); $1 \frac{mL}{L}$ de solución de vitaminas (10mg de biotina y 20mg de piridoxal-HCl en 100mL de agua destilada); y $4.5 \frac{g}{L}$ KOH. Los componentes se agregan en el mismo orden debido a los altos valores del pH, de esa forma se evita la precipitación de hierro y otras sales. El pH se ajustó a 6.5 y el medio se esterilizó a 121°C durante 15 min (Cordova-Rodriguez, et al., 2022).
- 8.2. Construcción de curva estándar
- 8.2.1. Se preparan 23 tubos de ensayo donde cada uno contiene 2mL de medio líquido estéril NFB, a cada tubo se le agrega 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11 o 12 μL de solución NH_4OH 0.93N (dicha solución se estandariza utilizando una solución de HCl 1.42N como estándar secundario). El volumen total de cada uno de los tubos se debe ajustar a 3mL utilizando más medio de cultivo. La concentración de nitrógeno de cada tubo se calcula en base al volumen total y el volumen de la solución de NH_4OH agregada. Se mide la absorbancia a 610nm y el pH se debe medir. El procedimiento se realiza en cuadruplicado y se obtiene una curva estándar de la absorbancia contra concentración de nitrógeno (Cordova-Rodriguez, et al., 2022).
- 8.3. Uso y validación de la curva estándar
- 8.3.1. La cantidad de nitrógeno fijado por *Acinetobacter pittii*, *A. baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Kosakonia oryzae* se determina usando la ecuación de la recta del modelo planteado y ajustado. Para cada especie bacteria se usa 100 μL de inóculo que contenga 10^3 UCF/mL esto se añade a 4.9mL del medio líquido NFB estéril y se incuban a 25°C durante 48h con agitación constante. Tras esto los tubos se centrifugan a 5000rpm y la absorbancia del medio se mide a 610nm con ayuda del espectrofotómetro (Cordova-Rodriguez, et al., 2022).
- 9. Esterilización de material**

No aplica

10. Cálculos
No aplica

11. Control de calidad

11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

12.1. Al momento de realizar el medio NFb es necesario agregar los reactivos en el mismo orden indicado, esto debido a las altas variaciones del pH, de esa forma se evita la precipitación del hierro y otras sales (Cordova-Rodriguez, et al., 2022).

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 4
Método de radiación ultravioleta para inducción de mutaciones aleatorias en bacterias diazotróficas	Autores: Isabella García Caffaro, Diana Aguilar

1. Propósito

Realizar el proceso de mutagénesis aleatoria mediante el uso de radiación UV, con el fin de mejorar la capacidad fijadora de nitrógeno de diferentes bacterias diazotróficas.

2. Aplicación

La irradiación con radiación UV es un proceso que genera lesiones en la secuencia de ADN, en específico en dímeros de pirimidina, donde estas lesiones no reparadas aumentan la tasa de errores de replicación (Jebril et al, 2021). Donde la longitud de onda ultravioleta efectiva es considerada aproximadamente en 255nm, la cual es la misma que la del espectro de absorción del ADN de las bacterias (Dong et al, 2011). La radiación UV es considerado un mutágeno estándar, donde su importancia recae en su fácil manipulación, presencia en la naturaleza, rentabilidad y amplia aplicación en áreas como desinfección con UV en la microbiología clínica y en ingeniería de evolución biotecnología (Shibai et al, 2017).

3. Referencias

- 3.1. del Cid Villatoro, J. D. (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.
- 3.2. García Caffaro, I., Castañon, J. (s.f) Método espectrofotométrico para la estimación de la fijación de nitrógeno de bacterias diazotróficas. Proyecto Suelos Ingenio Magdalena.

4. Terminología

- 4.1. Mutagénesis: Es el proceso en el cual el ADN de un organismo cambia, por lo que se genera una mutación genética. Esto puede ocurrir debido a errores de replicación del ADN, daños en el ADN y mediante técnicas de laboratorio (Durland y Ahmadian-Moghadam, 2022).
- 4.2. Bacterias diazotróficas: bacterias que cuentan con la habilidad de mejorar la absorción de nutrientes del suelo, en este caso pueden fijar el nitrógeno atmosférico, mediante la producción de amoníaco que es utilizable por la planta (Pankiewicz et al, 2021)

5. Documentos asociados

- 5.1. Dong, Y., Lin, H., Wang, H., Mo, X., Fu, K., & Wen, H. (2011). Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. *Minerals engineering*, 24(8), 870-875.
- 5.2. Jebril, N., Boden, R., & Braungardt, C. (2021). Use of ultraviolet-light mutagenesis to generate a mutant with elevated cadmium resistance, B. agri C15 CdR. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1879, No. 2, p. 022043). IOP Publishing.
- 5.3. Shibai, A., Takahashi, Y., Ishizawa, Y. et al. Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 7, 14531 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15008-1>
- 5.4. Pankiewicz, V., do Amaral, F., Ané, J.-M., & Stacey, G. (2021). Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 34(5), 491–498. doi:10.1094/mpmi-11-20-0316-fi
- 5.5. Durland J, Ahmadian-Moghadam H. Genetics, Mutagenesis. (2022). In: StatPearls [Internet]. Treasure

Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Prototipo de cámara UVGi P001 Serproma
- 7.1.2. Incubadora
- 7.1.3. Autoclave
- 7.1.4. Potenciómetro
- 7.1.5. Balanza analítica
- 7.1.6. Espectrofotómetro

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Tubos de ensayo
- 7.2.2. Micropipetas de 20, 100, y 1000 μL
- 7.2.3. Probetas
- 7.2.4. Cubetas para espectrofotómetro
- 7.2.5. Kimewipes
- 7.2.6. Puntas P1000, P100 y P20
- 7.2.7. Erlenmeyer de 500ml

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Estándar McFarland 0.5
- 7.3.2. Agar nutritivo
- 7.3.3. K_2HPO_4
- 7.3.4. MgSO_4
- 7.3.5. NaCl
- 7.3.6. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.7. $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- 7.3.8. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.9. H_3BO_3
- 7.3.10. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.11. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 7.3.12. Azul de bromotimol
- 7.3.13. KOH

- 7.3.14. Fe-EDTA
- 7.3.15. Biotina
- 7.3.16. piridoxal-HCl
- 7.3.17. NH₄OH
- 7.3.18. HCl

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No Aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. No aplica

8. Procedimiento

- 8.1. Aislamiento de las cepas de trabajo
 - 8.1.1. Seleccionar cepas para su posterior mutación
 - 8.1.2. Crecer las cepas seleccionadas en medio nutritivo o en agua peptonada overnight (ON)
 - 8.1.3. Sembrarlas en placa
 - 8.1.4. Dejar incubar a 37°C
- 8.2. Curvas de crecimiento
 - 8.2.1. Realizar curvas de crecimiento bacteriano empleando el medio seleccionado. En este caso, realizar curvas de crecimiento bacteriano en medio libre de nitrógeno para identificar la fase exponencial.
 - 8.2.2. Identificación de la fase exponencial.
- 8.3. Aplicación de irradiación UV
 - 8.3.1. Luego de identificar la fase exponencial mediante las curvas de crecimiento bacteriano, se debe de utilizar las bacterias en esa fase para irradiarlas con UV.
 - 8.3.2. Preparación de un estándar McFarland 0.5 a partir del cultivo en su fase exponencial de las cepas seleccionadas. Realizar diluciones seriadas hasta llegar a soluciones de 10⁶, 10⁴, y 10³ UFC/ml.
 - 8.3.3. Servir 100 uL de la dilución 10³ UFC/ml en una placa Petri con agar Nfb.
 - 8.3.4. Realizar en triplicado de acuerdo a los tiempos de exposición, en este caso cada 0, 3, y 4 segundos de radiación UV.
 - 8.3.5. Cargar las placas Petri en cabina de descontaminación UV individualmente y realizar el proceso de radiación UV de acuerdo al tiempo establecido.
 - 8.3.6. Proteger muestras de luz directa luego de este proceso.
 - 8.3.7. Incubar por 24 horas. En caso no se observe crecimiento luego de las 24 horas dejar incubando hasta observar crecimiento.
 - 8.3.8. Realizar conteo de colonias formadas para cada cepa utilizada.
 - 8.3.9. Almacenar muestras a 4°C (del Cid, 2022).
- 8.4. Estimación de la fijación de nitrógeno de bacterias diazotóficas
 - 8.4.1. Composición del medio de cultivo: La composición del medio líquido NFB para 500mL es la siguiente: 5g de ácido málico; 0.5g K₂HPO₄; 0.2g MgSO₄; 0.1g NaCl; 0.02g CaCl₂ · 2H₂O; 2mL solución de micronutrientes (0.04g CuSO₄ · 5H₂O; 0.12g ZnSO₄ · 7H₂O; 1.4g H₂BO₃; 1.0g Na₂MoO₄ · 2H₂O y 0.2g de bromotimol (5 mL de bromotimol en 0.175 M MnSO₄ · H₂O); 4 mL de solución de ácido Fe-etilendiaminotetraacético (EDTA) (16.4g Fe-EDTA); 1 mL de solución de vitaminas (10mg de biotina y 20mg de piridoxal-HCl en 100mL de agua destilada); y 4.5g KOH. Los componentes se agregan en el mismo orden debido a los altos valores del pH, de esa forma se evita la precipitación de hierro y otras sales. El pH se ajustó a 6.5 y el medio se esterilizó a 121°C durante 15 min (Cordova-Rodriguez, et al., 2022).
 - 8.4.2. Construcción de curva estándar: Se preparan 23 tubos de ensayo donde cada uno contiene 2mL de medio líquido estéril NFB, a cada tubo se le agrega 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11 o 12 µL de solución NH₄OH 0.93N (dicha solución se estandariza utilizando una solución de HCl 1.42N como estándar secundario). El volumen total de cada uno de los tubos se debe ajustar a 3mL utilizando más medio de cultivo. La concentración de nitrógeno de cada tubo se calcula en base al volumen total y el volumen de la solución de NH₄OH agregada. Se mide la absorbancia a 610nm y el pH se debe medir. El procedimiento se realiza en cuadruplicado y se obtiene una curva estándar de la absorbancia contra concentración de nitrógeno (Cordova-Rodriguez, et al., 2022).
 - 8.4.3. Uso y validación de la curva estándar: La cantidad de nitrógeno fijado se determina usando la ecuación de la recta del modelo planteado y ajustado. Para cada especie bacteria se usa 100µL de inóculo que contenga 10⁵ UCF/mL esto se añade a 4.9mL del medio líquido NFB estéril y se incuban a 25°C durante 48h con agitación constante. Tras esto los tubos se centrifugan a 5000rpm y la absorbancia del medio se mide a 610nm con ayuda del espectrofotómetro (Cordova-Rodriguez, et al.,

2022).

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

12.1.

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Realización de Curvas de Crecimiento	Autores: Isabella García Caffaro, Diana Aguilar

1. Propósito

Realizar una curva de crecimiento bacteriano por medio de espectrofotometría UV/Vis, con el fin de estudiar el efecto del medio de cultivo en el crecimiento de la población microbiana.

2. Aplicación

Las curvas de crecimiento bacteriano son empleadas para poder estudiar los efectos diferenciales de los medios de cultivo, la genética y el estrés en el crecimiento de la población microbiana (Tonner et al., 2017). Una curva de crecimiento bacteriano se encuentra dividida en cuatro fases: fase lag, crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. En la fase lag las bacterias se adaptan el nuevo entorno; en la fase logarítmica comienzan a dividirse mediante el proceso de fisión binaria y se alcanza la tasa máxima de crecimiento; en la fase estacionaria el número de células en proceso de división es igual al número de células muertas; en la fase de muerte ya no cuentan con la capacidad de dividirse (Wang, et al., 2015). Un método utilizado para la cuantificación del crecimiento bacteriano es mediante un método directo, conocido como espectrofotometría UV-Visible (López, 2016).

3. Referencias

3.1. Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *OD600 measurements using GENESYS spectrophotometers: Lesson plan for high school biology educators*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Flyers/genesys-od600-measurements-lesson-plan-FL64716.pdf>

4. Terminología

- 4.1. Fase lag: tiempo necesario para adaptarse al nuevo entorno e iniciar el metabolismo celular.
- 4.2. Fase exponencial: período donde hay suficientes nutrientes por lo que la división celular se produce a un ritmo constante.
- 4.3. Fase estacionaria: las condiciones se vuelven desfavorables para el crecimiento y las bacterias dejan de replicarse.
- 4.4. Fase de muerte: Cuando las células pierden viabilidad

5. Documentos asociados

- 5.1. Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., & Hinton, J. C. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- 5.2. López, L. (2016). Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes.
- 5.3. Tonner, P. D., Darnell, C. L., Engelhardt, B. E., & Schmid, A. K. (2017). Detecting differential growth of microbial populations with Gaussian process regression. *Genome research*, 27(2), 320–333. <https://doi.org/10.1101/gr.210286.116>
- 5.4. Wang, L., Fan, D., Chen, W. et al. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci Rep* 5, 15159 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep15159>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.

- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.
- 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
 - 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).
- 7. Equipo, materiales y reactivos**
 - 7.1. Equipo**
 - 7.1.1. Espectrofotómetro
 - 7.1.2. Incubadora
 - 7.2. Materiales/ Cristalería**
 - 7.2.1. Tubos de ensayo
 - 7.2.2. Asa de inoculación
 - 7.2.3. Micropipetas de 1000 y 100µL
 - 7.2.4. Puntas P1000 y P100
 - 7.2.5. Cubetas para espectrofotómetro
 - 7.2.6. Kimewipes
 - 7.3. Reactivos**
 - 7.3.1. Medio de cultivo
 - 7.4. Medicamentos**
 - 7.4.1. No aplica
 - 7.5. Material biológico**
 - 7.5.1. No aplica
- 8. Procedimiento**
 - 8.1. Cultivo overnight (ON)
 - 8.1.1. Contando con aislamientos de la bacteria deseada, seleccionar una sola colonia bacteriana utilizando un asa de inoculación estéril.
 - 8.1.2. Sumergir el asa de inoculación con la colonia seleccionada en 500 µL de medio de cultivo en un tubo Eppendorf de 1.5ml.
 - 8.1.3. Colocar tubo en incubadora y dejar incubando por 24 horas a 37°C.
 - 8.1.4. Luego de las 24 horas, transferir con micropipeta los 500 µL del cultivo bacteriano a 4.5 ml de medio de cultivo.
 - 8.1.5. Encender UV-Vis espectrofotómetro y medir el blanco en la longitud de onda de 600nm. Transferir el medio utilizado a la celda y colocar la celda en el soporte del espectrofotómetro. Seleccionar botón de blanco.
 - 8.1.6. Luego de medir el blanco, transferir el medio de cultivo bacteriano a la celda y medir su densidad óptica a 600 nm. Colocar el valor de absorbancia como tiempo 0.
 - 8.1.7. Regresar tubo con el medio de cultivo bacteriano a la incubadora.
 - 8.1.8. Cada 20 minutos repetir los pasos anteriores para medir su densidad óptica.
 - 8.2. Construcción de la curva de crecimiento
 - 8.2.1. Graficar los datos de absorbancia medidos en los diferentes tiempos. Valores de absorbancia en el eje-y, y los rangos de tiempo en el eje-x.
- 9. Esterilización de material**

Esterilizar tubos Eppendorf.

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

12.1. No aplica

12.2. Cuadros

Concentración (µg/ml)	Abs
0	0.000
2.171	0.001
4.344	0.001
6.516	0.002
8.690	0.002
10.864	0.003
13.039	0.003
15.215	0.005
17.391	0.006
19.569	0.008
21.747	0.010
23.925	0.010
26.105	0.013
28.285	0.015
30.466	0.016
32.647	0.019
34.829	0.021
37.013	0.023
39.196	0.024
41.381	0.028
43.566	0.029
47.939	0.032
52.314	0.035

Cuadro 12.1: Concentración de nitrógeno obtenida para la curva estándar, y sus datos de absorbancia

Cepa	Absorbancia			Promedio de Absorbancia y Desviación Estándar
2MO12	0.038	0.032	0.032	0.034 +/- 0.00346
2AP10	0.033	0.036	0.028	0.0323 +/- 0.00404
4AP9	0.045	0.041	0.043	0.043 +/- 0.002
1BP10	0.048	0.044	0.043	0.045 +/- 0.00265
1AB27	0.026	0.020	0.024	0.0233 +/- 0.00306
2MO14	0.039	0.038	0.032	0.0363 +/- 0.00379

Cuadro 12.2: Datos de absorbancia y resultados por cepa para la cuantificación de nitrógeno fijado

Cepa	Concentración fijada de nitrógeno (µg/ml)
2MO12	54.29 ± 4.95
2AP10	51.90 ± 5.77
4AP9	67.14 ± 2.86
1BP10	70.00 ± 3.78
1AB27	39.05 ± 4.36
2MO14	57.62 ± 5.41

Cuadro 12.3: Concentraciones de nitrógeno fijadas por las bacterias diazotróficas

Colonia	Media de la concentración de nitrógeno (µg/ml)	Desviación Estándar	Prueba t	Valor p	Significancia
1	83.8	0.825	<htest>	0.000223	*
2	76.2	0.825	<htest>	0.000384	*
3	93.8	0.825	<htest>	0.000129	*
4	69.0	1.65	<htest>	0.00307	*
5	89.0	0.825	<htest>	0.000164	*
6	89.5	0.825	<htest>	0.000160	*
7	70.0	1.43	<htest>	0.00207	*
8	86.2	0.825	<htest>	0.000193	*
9	86.7	0.825	<htest>	0.000188	*
10	71.0	0.825	<htest>	0.000624	*

Cuadro 12.4: Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 2AP10.

Colonia	Media de la concentración de nitrógeno (µg/ml)	Desviación Estándar	Prueba t	Valor p	Significancia
1	86.7	0.823	<htest>	0.000812	*
10	97.6	0.826	<htest>	0.000298	*
11	76.2	0.826	<htest>	0.00588	*
12	90.5	0.826	<htest>	0.000541	*
13	86.2	0.826	<htest>	0.000866	*
14	100	0.826	<htest>	0.000244	*
15	76.7	0.826	<htest>	0.00507	*
16	91.4	4.95	<htest>	0.0173	*
17	91.0	0.826	<htest>	0.000517	*
18	94.3	1.43	<htest>	0.00115	*
19	73.8	2.18	<htest>	0.0939	
2	91.0	0.826	<htest>	0.000517	*
20	92.4	0.826	<htest>	0.000453	*
21	92.4	0.826	<htest>	0.000453	*
22	95.2	0.820	<htest>	0.000352	*
23	77.6	0.826	<htest>	0.00389	*
24	79.0	0.826	<htest>	0.00276	*
3	77.6	0.826	<htest>	0.00389	*
4	70.5	2.18	<htest>	0.740	
5	90.5	0.826	<htest>	0.000541	*
6	78.1	0.826	<htest>	0.00345	*
7	89.5	0.826	<htest>	0.000595	*
8	93.3	0.826	<htest>	0.000417	*
9	91.9	0.826	<htest>	0.000473	*

Cuadro 12.5: Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 1BP10

Colonia	Media de la concentración de nitrógeno (µg/ml)	Desviación Estándar	Prueba t	Valor p	Significancia
1	90.0	1.43	<htest>	0.000534	*
2	91.9	0.826	<htest>	0.000160	*
3	77.1	1.43	<htest>	0.00130	*
4	70.0	1.43	<htest>	0.00275	*
5	95.7	1.43	<htest>	0.000394	*
6	72.9	1.43	<htest>	0.00197	*
7	69.0	0.826	<htest>	0.00104	*
8	87.1	1.43	<htest>	0.000631	*
9	89.0	0.826	<htest>	0.000188	*
10	92.9	2.47	<htest>	0.00136	*
11	84.3	1.43	<htest>	0.000751	*
12	80.5	2.98	<htest>	0.00428	*
13	94.8	2.97	<htest>	0.00179	*
14	77.1	1.44	<htest>	0.00131	*
15	72.4	2.18	<htest>	0.00480	*

Cuadro 12.6: Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 2MO12

Colonia	Media de la concentración de nitrógeno (µg/ml)	Desviación Estándar	Prueba t	Valor p	Significancia
1	77.1	1.43	<htest>	0.00673	*
2	70.5	2.97	<htest>	0.191	
3	87.1	1.43	<htest>	0.00170	*
4	87.1	3.78	<htest>	0.0117	*
5	77.6	2.97	<htest>	0.0258	*
6	91.0	2.18	<htest>	0.00279	*
7	87.1	1.43	<htest>	0.00170	*
8	74.3	1.43	<htest>	0.0131	*
9	67.6	0.825	<htest>	0.420	
10	75.2	2.18	<htest>	0.0234	*
11	71.4	3.78	<htest>	0.188	
12	96.7	2.18	<htest>	0.00182	*
13	60.0	2.86	<htest>	0.0495	*
14	62.4	2.18	<htest>	0.0635	
15	62.9	1.43	<htest>	0.0351	*
16	69.0	0.825	<htest>	0.0570	
17	72.9	1.43	<htest>	0.0202	*
18	59.0	3.60	<htest>	0.0599	
19	72.4	0.825	<htest>	0.00815	*
20	61.9	2.97	<htest>	0.0928	
21	66.7	0.825	<htest>	0.425	
22	71.4	1.43	<htest>	0.0351	*
23	61.9	0.825	<htest>	0.00817	*
24	63.3	0.825	<htest>	0.0153	*

Cuadro 12.7: Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 4AP9

Colonia	Media de la concentración de nitrógeno (µg/ml)	Desviación Estándar	Prueba t	Valor p	Significancia
1	74.8	2.97	<htest>	0.00230	*
2	79.0	1.65	<htest>	0.000567	*
3	75.2	2.18	<htest>	0.00121	*
4	81.9	1.65	<htest>	0.000494	*
5	82.4	2.18	<htest>	0.000845	*
6	81.0	0.826	<htest>	0.000129	*
7	79.5	0.825	<htest>	0.000138	*
8	86.2	1.65	<htest>	0.000407	*
9	84.8	1.65	<htest>	0.000432	*
10	77.6	1.65	<htest>	0.000608	*
11	86.7	0.823	<htest>	0.0000996	*
12	87.6	1.65	<htest>	0.000384	*
13	79.0	2.18	<htest>	0.000991	*
14	91.0	0.826	<htest>	0.0000843	*
15	93.8	0.827	<htest>	0.0000760	*
16	76.7	0.823	<htest>	0.000160	*
17	98.1	1.65	<htest>	0.000260	*
18	91.9	0.824	<htest>	0.0000810	*
19	91.9	0.826	<htest>	0.0000813	*
20	78.6	2.47	<htest>	0.00130	*
21	91.0	0.826	<htest>	0.0000843	*
22	102.0	0.831	<htest>	0.0000574	*
23	87.6	1.65	<htest>	0.000384	*
24	99.5	0.825	<htest>	0.0000620	*
25	88.1	0.825	<htest>	0.0000942	*
26	89.5	0.825	<htest>	0.0000890	*

Cuadro 12.8: Resultados de las pruebas t para cada colonia comparada con la media de la condición Antes, para la cepa 1AB27

12.3. Código

```
# Cargar la librería ggplot2
library(ggplot2)

# Leer los datos, archivo CSV
data <- read.csv("concentracion_nitrogeno.csv")

# Modelo ANOVA
modelo_anova <- aov(concentracion_nitrogeno ~ Cepa, data = data)

# Resumen del análisis de varianza
summary(modelo_anova)

# Si el valor p es menor que 0.05, significa que hay diferencias significativas.

# Histograma de los residuos
hist(residuals(modelo_anova), main="Histograma de los residuos", xlab="Residuos")
```

```

# Prueba de normalidad
shapiro.test(residuals(modelo_anova))

# Instalar car
if (!require(car)) {
  install.packages("car")
}
library(car)

# Prueba de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene)
leveneTest(concentracion_nitrogeno ~ Cepa, data = data)

# Comparaciones post-hoc de Tukey
tukey_resultado <- TukeyHSD(modelo_anova)

# Resultados de Tukey
print(tukey_resultado)
View(tukey_resultado)

# Boxplot de las concentraciones de nitrógeno por cepa
boxplot(concentracion_nitrogeno ~ Cepa, data = data,
        main = "Concentración de Nitrógeno Fijado por Cepa",
        xlab = "Cepa", ylab = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ ")
boxplot(concentracion_nitrogeno ~ Cepa, data = data,
        main = "Concentración de Nitrógeno Fijado por Cepa",
        xlab = "Cepa", ylab = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ ",
        cex.lab = 1.5,
        cex.axis = 1.5)

# Cargar dplyr
library(dplyr)

#1BP10
datos <- read.csv("1BP10 analisis.csv")
library(dplyr)
library(ggplot2)

# Calcular la media y desviación estándar para la condición "Antes"
concentracion_antes <- mean(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
sd_antes <- sd(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)

# Calcular la concentración máxima en "Despues" y obtener el número de la colonia correspondient
colonia_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues") %>%
  group_by(Colonia) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  slice_max(media_colonia, n = 1) %>%
  pull(Colonia)

```

```

concentracion_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues", Colonia == colonia_maxima_despues) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE)
  )

# Crear un dataframe con los resultados de las medias y desviación estándar
resultados_grafico <- data.frame(
  Condicion = c("Antes", "Max. Después"),
  Concentracion = c(concentracion_antes, concentracion_maxima_despues$media_colonia),
  Desviacion_Estandar = c(sd_antes, concentracion_maxima_despues$sd_colonia),
  Colonia = c("Antes", colonia_maxima_despues) # Añadimos el nombre de la colonia
)

# Calcular la diferencia porcentual
diferencia_porcentual <- ((concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes) /

# Crear el gráfico de barras con el porcentaje de diferencia en el título
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(
    title = paste(
      "Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
      "\nDiferencia: ", round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes,
        "\nµg/ml (", round(diferencia_porcentual, 2), "%)"
    ), # Añadir diferencia y porcentaje en el título
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno (µg/ml)"
  ) +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5)
  )
)

# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  )

```

```

),
width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
geom_text(aes(
  label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
labs(title = paste("Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
  "\nDiferencia: ",
  round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes, 2),
  x = "Condición",
  y = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ )" ) +
scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
theme_minimal() +
theme(
  axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
  axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
  axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
  axis.title.y = element_text(size = 16),
  plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5))

```

```
#2AP10
```

```
datos <- read.csv("2AP10 analisis.csv")
```

```
library(dplyr)
library(ggplot2)
```

```
# Calcular la media y desviación estándar para la condición "Antes"
```

```
concentracion_antes <- mean(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
```

```
sd_antes <- sd(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
```

```
# Calcular la concentración máxima en "Despues" y obtener el número de la colonia correspondient
```

```
colonia_maxima_despues <- datos %>%
```

```
  filter(Condicion == "Despues") %>%
```

```
  group_by(Colonia) %>%
```

```
  summarise(
```

```
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
```

```
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE),
```

```
    .groups = "drop"
```

```
  ) %>%
```

```
  slice_max(media_colonia, n = 1) %>%
```

```
  pull(Colonia)
```

```
concentracion_maxima_despues <- datos %>%
```

```
  filter(Condicion == "Despues", Colonia == colonia_maxima_despues) %>%
```

```
  summarise(
```

```
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
```

```

sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE)
)

# Crear un dataframe con los resultados de las medias y desviación estándar
resultados_grafico <- data.frame(
  Condicion = c("Antes", "Max. Después"),
  Concentracion = c(concentracion_antes, concentracion_maxima_despues$media_colonia),
  Desviacion_Estandar = c(sd_antes, concentracion_maxima_despues$sd_colonia),
  Colonia = c("Antes", colonia_maxima_despues) # Añadimos el nombre de la colonia
)

# Calcular la diferencia porcentual
diferencia_porcentual <- ((concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes) /

# Crear el gráfico de barras con el porcentaje de diferencia en el título
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(
    title = paste(
      "Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
      "\nDiferencia: ", round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes,
      "µg/ml (" , round(diferencia_porcentual, 2), "%)"
    ), # Añadir diferencia y porcentaje en el título
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno (µg/ml)"
  ) +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5)
  )
)

# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(

```

```

    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
labs(title = paste("Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
  "\nDiferencia: ",
    round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes, 2),
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ )" ) +
scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
theme_minimal() +
theme(
  axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
  axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
  axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
  axis.title.y = element_text(size = 16),
  plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5))

#2MO12
# Leer los datos
datos <- read.csv("2MO12 analisis.csv")

library(dplyr)
library(ggplot2)

# Calcular la media y desviación estándar para la condición "Antes"
concentracion_antes <- mean(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
sd_antes <- sd(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)

# Calcular la concentración máxima en "Despues" y obtener el número de la colonia correspondient
colonia_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues") %>%
  group_by(Colonia) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  slice_max(media_colonia, n = 1) %>%
  pull(Colonia)

concentracion_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues", Colonia == colonia_maxima_despues) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE)
  )

# Crear un dataframe con los resultados de las medias y desviación estándar
resultados_grafico <- data.frame(
  Condicion = c("Antes", "Max. Después"),
  Concentracion = c(concentracion_antes, concentracion_maxima_despues$media_colonia),

```

```

Desviacion_Estandar = c(sd_antes, concentracion_maxima_despues$sd_colonia),
Colonia = c("Antes", colonia_maxima_despues) # Añadimos el nombre de la colonia
)

# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  )),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(title = paste("Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
    "\nDiferencia: ",
    round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes, 2),
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ )" +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue"))) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5))
# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  )),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(title = paste("Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
    "\nDiferencia: ",
    round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes, 2),
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ )" +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue"))) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5))

```

```

#4AP9
# Leer los datos
datos <- read.csv("4AP9 analisis.csv")

# Calcular la media y desviación estándar para la condición "Antes"
concentracion_antes <- mean(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
sd_antes <- sd(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)

# Calcular la concentración máxima en "Despues" y obtener el número de la colonia correspondient
colonia_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues") %>%
  group_by(Colonia) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  slice_max(media_colonia, n = 1) %>%
  pull(Colonia)

concentracion_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues", Colonia == colonia_maxima_despues) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE)
  )

# Crear un dataframe con los resultados de las medias y desviación estándar
resultados_grafico <- data.frame(
  Condicion = c("Antes", "Max. Después"),
  Concentracion = c(concentracion_antes, concentracion_maxima_despues$media_colonia),
  Desviacion_Estandar = c(sd_antes, concentracion_maxima_despues$sd_colonia),
  Colonia = c("Antes", colonia_maxima_despues) # Añadimos el nombre de la colonia
)

# Calcular la diferencia porcentual
diferencia_porcentual <- ((concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes) /

# Crear el gráfico de barras con el porcentaje de diferencia en el título
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(

```

```

title = paste(
  "Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
  "\nDiferencia: ", round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes,
  "µg/ml (", round(diferencia_porcentual, 2), "%)"
), # Añadir diferencia y porcentaje en el título
x = "Condición",
y = "Concentración de Nitrógeno (µg/ml)"
) +
scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
theme_minimal() +
theme(
  axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
  axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
  axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
  axis.title.y = element_text(size = 16),
  plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5)
)

```

```

# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.9, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(title = paste("Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
    "\nDiferencia: ",
    round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes, 2),
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno (µg/ml)") +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5))

```

```
#1AB27
```

```
# Leer los datos
```

```
datos <- read.csv("1AB27 analisis.csv")
```

```
# Calcular la media y desviación estándar para la condición "Antes"
```

```
concentracion_antes <- mean(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
```

```
sd_antes <- sd(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
```

```

# Calcular la concentración máxima en "Despues" y obtener el número de la colonia correspondient
colonia_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues") %>%
  group_by(Colonia) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  slice_max(media_colonia, n = 1) %>%
  pull(Colonia)

concentracion_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues", Colonia == colonia_maxima_despues) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE)
  )

# Crear un dataframe con los resultados de las medias y desviación estándar
resultados_grafico <- data.frame(
  Condicion = c("Antes", "Max. Después"),
  Concentracion = c(concentracion_antes, concentracion_maxima_despues$media_colonia),
  Desviacion_Estandar = c(sd_antes, concentracion_maxima_despues$sd_colonia),
  Colonia = c("Antes", colonia_maxima_despues) # Añadimos el nombre de la colonia
)

# Calcular la diferencia porcentual
diferencia_porcentual <- ((concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes) /

# Crear el gráfico de barras con el porcentaje de diferencia en el título
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(
    title = paste(
      "Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
      "\nDiferencia: ", round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes,
      "\nµg/ml (", round(diferencia_porcentual, 2), "%)"
    ), # Añadir diferencia y porcentaje en el título
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno (µg/ml)"
  ) +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y

```

```

    axis.title.x = element_text(size = 16),      # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5)
  )
# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.9, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(title = paste("Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
    "\nDiferencia: ",
    round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes, 2),
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno ( $\mu\text{g/ml}$ )" ) +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14),      # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14),      # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16),      # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5))

```

```
#4AP9
```

```
# Leer los datos
```

```
datos <- read.csv("4AP9 analisis.csv")
```

```
# Calcular la media y desviación estándar para la condición "Antes"
```

```
concentracion_antes <- mean(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
```

```
sd_antes <- sd(datos$Concentracion[datos$Condicion == "Antes"], na.rm = TRUE)
```

```
# Calcular la concentración máxima en "Despues" y obtener el número de la colonia correspondient
```

```
colonia_maxima_despues <- datos %>%
```

```
  filter(Condicion == "Despues") %>%
```

```
  group_by(Colonia) %>%
```

```
  summarise(
```

```
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
```

```
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE),
```

```
    .groups = "drop"
```

```
  ) %>%
```

```
  slice_max(media_colonia, n = 1) %>%
```

```
  pull(Colonia)
```

```

concentracion_maxima_despues <- datos %>%
  filter(Condicion == "Despues", Colonia == colonia_maxima_despues) %>%
  summarise(
    media_colonia = mean(Concentracion, na.rm = TRUE),
    sd_colonia = sd(Concentracion, na.rm = TRUE)
  )

# Crear un dataframe con los resultados de las medias y desviación estándar
resultados_grafico <- data.frame(
  Condicion = c("Antes", "Max. Después"),
  Concentracion = c(concentracion_antes, concentracion_maxima_despues$media_colonia),
  Desviacion_Estandar = c(sd_antes, concentracion_maxima_despues$sd_colonia),
  Colonia = c("Antes", colonia_maxima_despues) # Añadimos el nombre de la colonia
)

# Calcular la diferencia porcentual
diferencia_porcentual <- ((concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes) /

# Crear el gráfico de barras con el porcentaje de diferencia en el título
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),
  width = 0.2, color = "black") + # Añadir barras de error para desviación estándar
  geom_text(aes(
    label = ifelse(Condicion == "Max. Después", paste("Colonia: ", Colonia), "")
  ), vjust = -0.5, size = 6) + # Mostrar la colonia solo en "Max. Después"
  labs(
    title = paste(
      "Concentración de Nitrógeno Fijada Antes y Después de la Mutagénesis",
      "\nDiferencia: ", round(concentracion_maxima_despues$media_colonia - concentracion_antes,
      "\nµg/ml (", round(diferencia_porcentual, 2), "%)"
    ), # Añadir diferencia y porcentaje en el título
    x = "Condición",
    y = "Concentración de Nitrógeno (µg/ml)"
  ) +
  scale_fill_manual(values = c("Antes" = "#B0BEC5", "Max. Después" = "lightblue")) + # Colores
  theme_minimal() +
  theme(
    axis.text.x = element_text(angle = 0, hjust = 0.5, size = 14), # Aumentar el tamaño de los
    axis.text.y = element_text(size = 14), # Aumentar el tamaño de los textos en el eje Y
    axis.title.x = element_text(size = 16), # Aumentar el tamaño del título del eje X
    axis.title.y = element_text(size = 16),
    plot.title = element_text(size = 17, hjust = 0.5)
  )
)

# Crear el gráfico de barras con los valores exactos encima y las barras de error
ggplot(resultados_grafico, aes(x = Condicion, y = Concentracion, fill = Condicion)) +
  geom_bar(stat = "identity", show.legend = FALSE) + # Crear las barras
  geom_errorbar(aes(
    ymin = Concentracion - Desviacion_Estandar,
    ymax = Concentracion + Desviacion_Estandar
  ),

```