

	<b>GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS</b>	<b>Código</b>	FO-SB-12/v0
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>	<b>Página</b>	<b>1/1</b>

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

**AUTOR(ES):**

**NOMBRE(S):** JAIRO ALBERTO **APELLIDOS:** ROJAS JAIME  
**NOMBRE(S):** \_\_\_\_\_ **APELLIDOS:** \_\_\_\_\_

**FACULTAD:** \_\_\_\_\_ CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**DIRECTOR:**

**NOMBRE(S):** LAURA **APELLIDOS:** MORENO ROZO

**TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS):** CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DIAZOTROFOS OBTENIDOS A PARTIR DE SUELOS RIZOSFÉRICOS DE CULTIVOS DE CAÑA (*Saccharum officinarum*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*), NORTE DE SANTANDER PARA SU USO COMO POTENCIALES BIOFERTILIZANTES.

### RESUMEN

En el presente trabajo, se reactivaron 32 aislados provenientes de suelo rizosféricos de cultivos de caña de azúcar y café de los municipios del Zulia y Labateca, Norte de Santander, pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*. Se caracterizaron macroscópica y microscópicamente.

Con el objetivos de caracterizar el potencial biofertilizante de estas bacterias diazotrofas, se cuantificaron actividades de promoción de crecimiento vegetal como síntesis de compuestos indólicos, solubilización de fósforo inorgánico, síntesis de sideróforos, fijación biológica de nitrógeno, se seleccionaron los mejores aislados mediante un análisis estadístico según el programa IBM SPSS Statistics 19, se les realizó una identificación molecular mediante amplificación por técnica de PCR, y se obtuvieron cepas promisorias del género *Azospirillum*, *Burkholderia* y *gluconacetobacter*, y se les aplicó una técnica de conservación a los aislados en solución salina estéril (0,85% NaCl).

**PALABRAS CLAVES:** PGPR, Caña, Café, Diazotrofas, identificación molecular

### CARACTERÍSTICAS:

**PÁGINAS:** 118 **PLANOS:** \_\_\_\_\_ **ILUSTRACIONES:** \_\_\_\_\_ **CD ROOM:** 1

<b>Elaboró</b>		<b>Revisó</b>		<b>Aprobó</b>	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
<b>Fecha</b>	24/10/2014	<b>Fecha</b>	05/12/2014	<b>Fecha</b>	05/12/2014

COPIA NO CONTROLADA

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DIAZOTROFOS OBTENIDOS A PARTIR DE SUELOS RIZOSFÉRICOS DE CULTIVOS DE CAÑA (*Saccharum officinarum*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*), NORTE DE SANTANDER PARA SU USO COMO POTENCIALES BIOFERTILIZANTES.

JAIRO ALBERTO ROJAS JAIME

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS  
BACTERIANOS DIAZOTROFOS OBTENIDOS A PARTIR DE SUELOS RIZOSFÉRICOS  
DE CULTIVOS DE CAÑA (*Saccharum officinarum*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*), NORTE DE  
SANTANDER, PARA SU USO COMO POTENCIALES BIOFERTILIZANTES.

JAIRO ALBERTO ROJAS JAIME

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de

Ingeniero Biotecnológico

Directora

LAURA MORENO ROZO

Microbióloga

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 15 DE DICIEMBRE DE 2015

HORA: 4:00 P.M.

LUGAR: EDIFICIO CREAD SALA N°04

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA

**TÍTULO:** "CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS BACTERIANOS DIAZOTROFOS OBTENIDOS A PARTIR DE SUELOS RIZOSFERICOS DE CULTIVOS DE CAÑA (*Soccharum officinarum*) Y CAFÉ (*Coffea arabica*), NORTE DE SANTANDER PARA SU USO COMO POTENCIALES BIOFERTILIZANTES.

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO  
LEIDY DIANA ARDILA LEAL  
MARÍA ESPERANZA RODRIGUEZ

**DIRECTOR:** LAURA YOLIMA MORENO ROZO

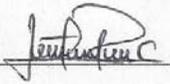
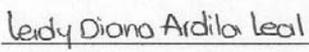
**NOMBRE DEL ESTUDIANTE**  
JAIRO ALBERTO ROJAS JAIME

**CÓDIGO**  
1610181

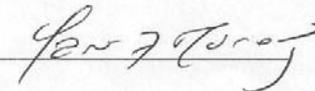
**CALIFICACIÓN**  
4.5

**OBSERVACIONES:**  
MERITORIA

**FIRMA DE LOS JURADOS:**

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular



## **Agradecimientos**

Este logro se lo dedico Dios, y a la Santísima Virgen María, por ser mi guía espiritual.

A mis padres, José Tobias Rojas Parra y Doris Remigia Jaime Santiago. Porque con su amor y dedicación constante lograron formar un ser de buenos principios y de carácter, por apoyarme y enseñarme que en la vida todo es posible. Este logro es fruto de sus sacrificios.

A mis hermanos José Leonardo y Yully Andrea, por brindarme ese ánimo esas alegrías que potenciaban mis ganas de seguir.

A mi hija Andrea Valentina, por ser la luz de mis ojos y generar esas ganas de triunfar, por darme su amor cálido creador de energía y máxima alegría de mi vida. A cada uno de mis familiares brindarme su apoyo.

A todas y cada una de las personas que hicieron posible este trabajo: a la profesora Laura Yolima Moreno Rozo, con su gran dedicación durante el desarrollo y formación de mi carrera, ejempló a seguir en ese esfuerzo de lograr la formación del ser y del saber, por ser mi jefe y en especial amiga, por brindarme la oportunidad de formarme como ingeniero biotecnológico brindándome su apoyo y abriéndome las puertas del laboratorio de microbiología, por hacerme parte del semillero de investigación en biotecnología aplicada (SEIBA), y por la elaboración de este proyecto, a las Ingenieras Sandra, Sheby y Paola por sus ánimos y su amistad. A la profesora Diana Cárdenas por orientarme en este proceso.

Jairo Alberto Rojas Jaime.

## Contenido

	<b>pág.</b>
Introducción	14
1. El Problema	17
1.1 Título	17
1.2 Planteamiento del Problema	17
1.3 Formulación del Problema	20
1.4 Justificación	20
1.5 Objetivos	22
1.5.1 Objetivo general	22
1.5.2 Objetivos específicos	22
1.6 Delimitaciones	23
1.6.1 Delimitación espacial	23
1.6.2 Delimitación temporal	23
1.6.3 Delimitación conceptual	23
2. Marco Referencial	24
2.1 Antecedentes	24
2.2 Marco Teórico	26
2.2.1 Cultivo de la caña de azúcar	26
2.2.2 Cultivo de café	27
2.2.3 Nitrógeno	28
2.2.4 Fosforo y su importancia agrícola	29
2.2.5 Solubilización del fósforo	30

2.2.6 Hierro	30
2.2.7 Fijación biológica del nitrógeno	31
2.2.8 Sideróforos	32
2.2.9 Producción de sustancias indólicas (AIA)	33
2.2.10 Rizosfera	34
2.2.11 Diazótrofas	34
2.2.12 Identificación molecular	37
2.2.13 Electroforesis	38
2.2.14 Método conservación.	38
2.3 Marco Legal	39
3. Diseño Metodológico	41
3.1 Tipo de Investigación	41
3.2 Población y Muestra	41
3.2.1 Población.	41
3.2.2 Muestra.	41
3.3 Hipótesis	41
3.4 Variables	42
3.4.1 Variables dependientes	42
3.4.2 Variables independientes	42
3.5 Fases de la Investigación	42
3.5.1 Activación de los aislados	42
3.5.2 Caracterización Fisiológica de los aislados	43
3.5.2.1 Determinación de la producción de compuestos indólicos	44
3.5.2.2 Determinación de solubilización de fosfato	45

3.5.2.3 Evaluación de la síntesis de sideróforos	46
3.5.2.4 Determinación de la fijación biológica de nitrógeno	48
3.5.2.6 Identificación molecular	52
4. Resultados y Discusiones	56
4.1 Reactivación de Cepas e Identificación Macroscópica y Microscópica	56
4.1.1 Caracterización fenotípica género <i>Burkholderia</i> .	56
4.1.2 Caracterización fenotípica del género <i>Gluconacetobacter sp</i>	62
4.1.3 Caracterización fenotípica del género <i>Azospirillum sp</i>	67
4.1.4 Caracterización fenotípica del género <i>Herbaspirillum sp</i>	71
4.1.5 Caracterización fenotípica de aislados del género <i>Azotobacter</i>	72
4.2 Caracterización de Actividades Asociadas a la Promoción de Crecimiento Vegetal	76
4.2.1 Solubilización de fosfatos	80
4.2.2 Producción de sideróforos.	80
4.2.3 Fijación biológica de nitrógeno	81
4.2.4 Selección de aislados diazotrofos por sus actividades promotoras del crecimiento vegetal	82
4.3 Identificación molecular	86
4.3.1 Aislamiento de ADN bacteriano.	86
4.3.2 Reacción en cadena de la <i>polimerasa</i> , PCR	87
4.4 Conservación de los Aislados	89
5. Conclusiones	90
5. Recomendaciones	91
6. Referencias Bibliográficas	92
Anexos	104

## Lista de Figuras

	<b>pág.</b>
Figura 1. Caracterización macroscópica (1); morfología microscópica, <i>cocobacilos</i> Gram negativos (2)	43
Figura 2. Ajuste densidad óptica 0.5 al inóculo bacteriano	44
Figura 3. Determinación de Pruebas fisiológicas (Ácido Indol acético; producción de sideróforos y Solubilización de fósforo)	48
Figura 4. Determinación de fijación biológica de nitrógeno	50
Figura 5. Viabilidad y pureza en medios selectivos (JNFB, LGI-P, ROJO Congo, ASBHY-Manitol, JMV)	56
Figura 6. Morfología cocobacilar y presencia de estructuras de resistencia (quistes).	75
Figura 7. Dendrograma de similitudes en las actividades promotoras de crecimiento vegetal por los aislamientos de <i>diazotrofas</i>	84
Figura 8. ADN de los aislados <i>Diazotrofos</i>	86
Figura 9. Identificación mediante PCR de <i>A. brasilense</i>	87
Figura 10. Identificación mediante PCR de <i>B. glumae</i>	88