



## RESUMEN TESIS DE GRADO

**AUTOR (ES):**

**NOMBRE (S):** CLAUDIA YOHANNA

**APELLIDOS:** LIZCANO CORONEL

**NOMBRE (S):** TATIANA

**APELLIDOS:** RANGEL RUBIO

**NOMBRE (S):** DAYANA ANDREA

**APELLIDOS:** VÁSQUEZ BARAJAS

**FACULTAD:** CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**DIRECTOR:**

**NOMBRE (S):** LAURA YOLIMA

**APELLIDOS:** MORENO ROZO

**TÍTULO DE LA TESIS:** IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS AISLADAS A PARTIR DE SUELOS, RAÍCES Y MATERIAL FOLIAR EN CULTIVOS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

**RESUMEN:**

En este trabajo se caracterizaron seis fincas con cultivos de tomate del municipio de Chinácota, Norte de Santander, Colombia, realizando una cuantificación de bacterias diazóticas mediante la técnica de NMP a partir de muestras de suelo, raíces y material foliar encontrándose diferencias significativas en la población celular en relación al género en suelo y material foliar en el medio Nfb para las seis fincas estudio; se establecieron relaciones entre parámetros fisicoquímicos y microbiológicos no encontrándose diferencias significativa, y se obtuvieron 61 aislados en medios selectivos para *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter* sp. y *Herbaspirillum* sp.

Palabras clave: aislamiento, cuantificación, diazótico, PCR, identificación bioquímica y molecular.

**CARACTERÍSTICAS:**

**PAGINAS:** 208

**PLANOS:**

**ILUSTRACIONES:**

**CD-ROM:** 1

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS  
DIAZOTRÓFICAS AISLADAS A PARTIR DE SUELOS, RAÍCES Y MATERIAL  
FOLIAR EN CULTIVOS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

CLAUDIA YOHANNA LIZCANO CORONEL  
TATIANA RANGEL RUBIO  
DAYANA ANDREA VÁSQUEZ BARAJAS

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2014

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS  
DIAZOTRÓFICAS AISLADAS A PARTIR DE SUELOS, RAÍCES Y MATERIAL  
FOLIAR EN CULTIVOS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)

CLAUDIA YOHANNA LIZCANO CORONEL  
TATIANA RANGEL RUBIO  
DAYANA ANDREA VÁSQUEZ BARAJAS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniero Biotecnológico

Director  
LAURA YOLIMA MORENO ROZO  
Microbióloga, M Sc., Biotecnología de los Microorganismos

Codirector  
SANDRA MILENA LÓPEZ PÉREZ  
Ingeniera de Producción Biotecnológica

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2014



ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 24 FEBRERO DEL 2014 HORA: 2:00 P.M.

LUGAR: SALA 3 DEL CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO DE LA TESIS: "IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS AISLADAS A PARTIR DE SUELOS, RAÍCES Y MATERIAL FOLIAR EN CULTIVOS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)."

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

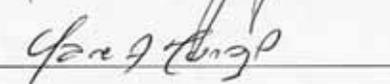
JURADOS: MAYRA CONTRERAS ROJAS  
FABIAN GALVIS SERRANO  
ARTURO RAMIREZ SULVARAN

DIRECTOR: LAURA YOLIMA MORENO ROZO

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
CLAUDIA YOHANNA LIZCANO CORONEL	1610450	4.8
TATIANA RANGEL RUBIO	1610458	4.8
DAYANA ANDREA VÁSQUEZ BARAJAS	1610457	4.8

OBSERVACIONES: MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:

  
Vo. Bo. Coordinador Comité Curricular 

“Después de nacer, esto es lo mejor que me ha pasado, la experiencia cuesta mucho mas que esfuerzo, dedicación, enseñanza y amistad y puedo decir que se dejó todo en el rin”

Esto se lo dedico a Dios, quien es mi guía, fortaleza y nada me faltara a su lado.

A mis padres María del Pilar y Jose Rafael, pues esto es completamente suyo, parte de su esfuerzo, labor diaria, exigencias y enseñanzas.

A mi hermana Luz Adriana Lizcano por el positivismo que siempre tuvo conmigo, por ser más que una hermana diariamente.

A dos personas que me llenan de alegría mis sobrinos (Samuel y María Isabel), espero ser un buen ejemplo para ellos.

A mis abuelos por su amor y enseñanza que desde el cielo me acompañan y me cuidan, los amare siempre.

A mi familia que siempre creyó en que sería capaz, ejemplo de alegría y amor.

A aquellos docentes que me orientaron siempre que los necesité Laura Y. Moreno, por orientar mi percepción de la vida misma.

A mis amigos y compañeros de lucha por estar ahí siempre.

**Claudia Yohanna Lizcano Coronel.**

La vida nos muestra sus caminos cada uno decide cuál de ellos quiere andar; ustedes hicieron parte de él, y es esa la razón por la que hoy quiero dedicarles este logro:

Gracias a Dios y al espíritu santo por iluminar mi camino.

A mis padres Carlina y Carlos por sus enseñanzas, exigencias, esfuerzos y su apoyo incondicional.

A mis hermanos Andres, Yuly que a pesar de estar lejos, siempre cuento con ellos. A mi consentida Vivi por brindarme su cariño, ternura y alegrarme los días con sus llamadas.

A mi abuela, tíos y tías. Especialmente a José Alejo por ser mi modelo desde niña y enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

A Rafael D. Cafiel, por su amor, apoyo incondicional, comprensión y acompañamiento en este proceso de formación.

A mis docentes Gloria E. Flórez, Blanca I. Botello y Laura Y. Moreno, por su cariño, enseñanzas, amistad y confianza.

A todas aquellas personas que de una u otra forma se convirtieron en mis padres adoptivos, siempre les estaré inmensamente agradecida por su colaboración.

A mi amigo y hermano Sergio Andrés, lo estamos logrando!!!

A mi amigo Hermes Pedraza por sus poemas, su compañía y apoyo incondicional.

A mis amigas y compañeras: Dayana, Claudia, Dayanita, Yenis, Patricia, Karina.

**Tatiana Rangel Rubio**

“Solo para llegar a la meta, se necesita de un pensamiento perseverante, un espíritu luchador y un corazón humilde”

Este logro se lo dedico Dios, por permitirme vivir bajo el firmamento azul, por ser la energía que necesita mi espíritu y la esperanza en momento de derrota.

A mis padres, Cristina Barajas Rojas y Luis Eduardo Vásquez M., 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, solo debemos persistir, resistir y nunca desistir. Este logro es fruto de sus sacrificios por eso les pertenece más a ellos que a mí.

A mi hermano Eduardo Felipe por ser un ejemplo de coraje, disciplina y sencillez. A cada uno de mis familiares y amigos por brindarme su apoyo.

A mis amigas de esta lucha y hermanas de la vida, Tatiana y Claudia por permitirme recorrer y compartir parte de sus vidas conmigo, dejando nuevas enseñanzas. A mi tutora Laura Y. Moreno por no solo ser un apoyo en la formación profesional, si no por convertirse en una voz de aliento, al creer y confiar en mí como persona. También a la Ing. Sandra Milena López por brindarme sus conocimientos y guiar mis pasos en momentos difíciles.

**Dayana Andrea Vásquez Barajas**

## **AGRADECIMIENTOS**

Las autoras expresan sus agradecimientos a:

A Dios, por permitirnos existir y soñar cada día, por ser la fortaleza para mantener vivas nuestras ilusiones, regalarnos familias maravillosas y por concedernos descubrir amigos incondicionales.

A nuestros padres, por brindarnos hogares amorosos y unidos, por su formación como personas y por su apoyo constante, para que alcancemos nuestras metas.

A la Universidad Francisco de Paula Santander, al ofrecernos un soporte para construir nuestros saberes y darnos las herramientas para poder efectuar el proyecto de grado.

A nuestra tutora la MSc. Laura Yolima Morenos R. por habernos concedido realizar el proyecto de grado bajo su dirección, por su paciencia y amor para guiarnos por el camino de la formación profesional, por compartirnos sus conocimientos, experiencia y sabiduría. Expresaremos siempre nuestra gratitud por brindarnos todos los días su alegría y amistad. Ella será en nuestras vidas, un ángel de la guarda, de forma terrenal.

A nuestra codirectora, la Ing. Sandra Milena López P. por su disponibilidad para ayudarnos y su paciencia al orientarnos en el desarrollo de la investigación, por su amistad incondicional y por compartir parte de su vida con nosotras.

A nuestro compañero Jairo Alberto Rojas Jaimes y a la Ing. Andrea Paola Molinares, por su cooperación constante en este proceso.

A los asesores y colaboradores, que con sus conocimientos, amabilidad y disponibilidad fueron orientando nuestras decisiones, durante el transcurso de la investigación.

A Sandra Patricia Angarita Laverde, por ser nuestra madrina; sus cuidados y espíritu, nos alentaron para seguir adelante todos los días.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. EL PROBLEMA	20
1.1 TÍTULO	20
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
1.4 JUSTIFICACIÓN	21
1.5 OBJETIVOS	22
1.5.1 Objetivo general	22
1.5.2 Objetivos específicos	22
1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES	23
1.6.1 Alcances	23
1.6.2 Limitaciones	23
1.7 DELIMITACIÓN	23
1.7.1 Delimitación espacial	23
1.7.2 Delimitación temporal	24
1.7.3 Delimitación conceptua	24
2. MARCO REFERENCIAL	25
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	25
2.2 MARCO TEÓRICO	27

2.2.1 Generalidades del cultivo de tomate	27
2.2.2 Clasificación taxonómica	28
2.2.3 Fenología del cultivo	30
2.2.4 Nutrición de <i>L. esculentum</i> cultivado al aire libre.	31
2.2.5 Agroecología del cultivo	32
2.2.6 Prácticas culturales	33
2.2.7 Diazótrofo	35
2.2.8 Diazótrofas de interés biotecnológico	36
2.2.9 Número más probable (NMP)	39
2.2.10 Caracterización morfológica de bacterias diazótrofes	40
2.2.11 Identificación bioquímica	42
2.2.12 Identificación molecular	42
2.2.13 Análisis estadístico	48
2.3 MARCO LEGAL	48
3. METODOLOGÍA	50
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	50
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA	50
3.2.1 Población	50
3.2.2 Muestra	50
3.3 FASES DE LA INVESTIGACIÓN	50
3.3.1 Caracterización de las zonas de muestreo	50
3.3.2 Toma de muestra	50
3.3.3 Cuantificación mediante la técnica del Número Más Probable	52
3.3.4 Análisis fisicoquímicos del suelo rizosférico	54

3.3.5 Análisis estadístico	54
3.3.6 Aislamiento a cultivo puro y caracterización de los aislados	54
3.3.7 Identificación molecular	57
3.3.8 Técnica de conservación	60
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	62
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO	62
4.2 TOMA DE MUESTRAS	65
4.3 CUANTIFICACIÓN NMP	66
4.3.1 Cuantificación de diazótrofes en suelo rizosférico	66
4.3.2 Cuantificación de diazótrofes en raíces y material foliar	70
4.4 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE SUELOS RIZOSFÉRICOS	75
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
4.6 AISLAMIENTO A CULTIVO PURO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS	78
4.6.1 Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Azotobacter</i> sp	81
4.6.2 Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Azospirillum</i> sp	95
4.6.3 Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Herbaspirillum</i> sp	103
4.6.4 Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Burkholderia</i> sp	108
4.6.5 Caracterización macroscópica y microscópica del género <i>Gluconacetobacter</i> sp	121
4.7 MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA BBL CRYSTAL	125
4.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	129

4.8.1 Búsqueda de cebadores en NCBI	129
4.8.2 Comprobación de la especificidad de los cebadores	129
4.8.3 Modificación de cebadores	130
4.8.4 Diseño de cebadores para la identificación de diazótrofes	131
4.8.5 Aislamiento de ADN bacteriano	137
4.9 TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN	143
5. CONCLUSIONES	144
6. RECOMENDACIONES	145
BIBLIOGRAFIA	146
ANEXOS	160