

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS	Código	FO-SB-12/v0
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	Página	1/115

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

NOMBRE(S): MARIA LUISA APELLIDOS: COLOBON PRETEL

NOMBRE(S): ERIKA YARAIMA APELLIDOS: BAUTISTA RINCON

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

DIRECTOR: LILIANA YANETH SUAREZ CONTRERAS

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): CARACTERIZACION MOLECULAR MEDIANTE ITS EN HONGOS HIDROCARBONOCLATA DEL BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

RESUMEN

Se caracterizaron molecularmente diez cepas con capacidad hidrocarbonoclasta que se encontraban en el banco de cepas de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente ubicado en la sede Complejo Experimental Campos Elíseos de la UFPS, estas cepas pertenecían a los géneros de hongos (*Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.) que fueron aislados de residuos petroleros biorremediados en la empresa de Aseo Urbano S.A.S. E.S.P. Estos son hongos con potencial de degradar hidrocarburos. Para su caracterización molecular se llevó a cabo un proceso de extracción de ADN genómico, Se amplificaron las secuencias ITS utilizando la técnica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los amplicones fueron secuenciados y sometidos a un análisis BLASTn en la base de datos GenBank de la NCBI en donde se encuentra disponible el registro de secuencias de ADN estandarizados para establecer la especie con la que compartían el mayor número de nucleótidos, obteniendo como resultado identificaciones con porcentajes comprendidos entre el 98% y 100%; Donde dos hongos obtuvieron con la identidad en el 100% de su longitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus niger*, *Lichtheimia ramosa*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium oxalicum* y *Geotrichum candidum*.

PALABRAS CLAVE: PCR, hongos filamentosos, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp, *Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp.

CARACTERISTICAS:

PÁGINAS: 110 PLANOS: ___ ILUSTRACIONES: ___ CD ROOM: ___

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ITS DE HONGOS
HIDROCARBONOCLASTA DEL BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO
DE PAULA SANTANDER, COMPLEJO EXPERIMENTAL CAMPOS ELÍSEOS.

MARIA LUISA COLOBÓN PRETEL
ERIKA YARAIMA BAUTISTA RINCÓN

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

2019

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR- ITS DE HONGOS HIDROCARBONOCLASTA DEL
BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER,
COMPLEJO EXPERIMENTAL CAMPOS ELÍSEOS.

MARIA LUISA COLOBÓN PRETEL

ERIKA YARAIMA BAUTISTA RINCÓN

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

Biotecnológico

Modalidad: Investigación

Directora:

LILIANA YANETH SUÁREZ CONTRERAS

Licenciada en Biología y Química

Maestría en Biología énfasis Genética

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

2019

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 28 DE FEBRERO DE 2019

HORA: 03:00 P.M

LUGAR: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ITS DE HONGOS
HIDROCARBONOLASTA DEL BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE
PAULA SANTANDER, COMPLEJO EXPERIMENTAL CAMPOS ELÍSEOS"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO: ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO
GERMAN LUCIANO LOPEZ BARRERA
ARIADNA HAZEL VERGEL SUAREZ

ENTIDAD: UFPS


DIRECTOR: LILIANA YANETH SUAREZ CONTRERAS

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
MARIA LUISA COLOBON PRETEL	1610916	4.4
ERIKA YARAIMA BAUTISTA RINCON	1610882	4.4

OBSERVACIONES: APROBADO.

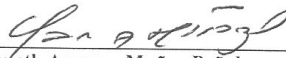
FIRMA DE LOS JURADOS


Andres Fernando Barajas Solano


German Luciano Lopez Barrera


Ariadna Hazel Vergel Suarez

Vo.Bo Coordinador Comité Curricular


Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza

Resumen

Se caracterizaron molecularmente diez cepas con capacidad hidrocarbonoclasta que se encontraban en el banco de cepas de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente ubicado en la sede Complejo Experimental Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, estas cepas pertenecían a los géneros de hongos (*Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.,) que fueron aislados de residuos petroleros biorremediados en la empresa de Aseo Urbano S.A.S. E.S.P. Estos son hongos con potencial de degradar hidrocarburos que fueron clasificados utilizando técnicas de identificación macroscópica, microscópica (observación de las estructuras celulares y las colonias); y bioquímicas, mediante el empleo de medios especiales para identificar las rutas metabólicas.

Para su posterior caracterización molecular se llevó a cabo un proceso de extracción de ADN genómico, Se amplificaron las secuencias ITS utilizando la técnica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los amplicones obtenidos se verificaron por electroforesis usando como agente intercalante Gel Red y se compararon con el marcador de peso molecular de 1Kb, Posteriormente se realizó la cuantificación de ADN de los amplicones por espectrofotometría usando el Nanodrop Thermo Scientific 2000, teniendo la concentración de cada amplicón.

Los amplicones fueron secuenciados y sometidos a un análisis BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos GenBank de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) en donde se encuentra disponible el registro de secuencias de ADN estandarizados para establecer la especie con la que compartían el mayor número de nucleótidos, obteniendo como resultado identificaciones con porcentajes comprendidos entre el 98% y 100%;

Donde dos hongos obtuvieron con la identidad en el 100% de su longitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus niger*, *Lichtheimia ramosa*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium oxalicum*.

Luego de obtener las especies de cada una de los hongos mediante el uso de los ITS 4 y 5, se procedió a realizar un alineamiento de las secuencias de ADN usando el Software Clustal X, para luego construir el correspondiente árbol filogenético con el programa TreeWiew determinando las relaciones genéticas entre cada género y especie.

Palabras clave: PCR, marcador molecular, ITS, hongo hidrocarbonoclasta, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp., y *Aspergillus* sp.

Dedicado a nuestros seres queridos, que día a día nos impulsaron a culminar nuestro proyecto con su ánimo, amor y comprensión, y en especial al ser más importante en nuestras vidas Dios

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento por la culminación de mi proyecto es para el ser más importante de mi vida DIOS; quien es mi motor de impulso, motivación, fe y esperanza en mi vida, gracias, por brindarme esta oportunidad y tengo la seguridad que serán muchas más, por cada persona que puso durante esta etapa de mi vida, cada uno de ellos fue una lección aprendida de enriquecimiento personal.

A mi ALMA MATER por ser mi academia de aprendizaje durante varios años, el cual me enseñó a formarme como profesional y lo más importante formarme como persona para ser parte y dar ejemplo a la sociedad.

A mi padre DARIO BAUTISTA por brindarme su apoyo y comprensión durante este recorrido de mi vida, por sus consejos, por enseñarme que a pesar de las adversidades siempre hay que seguir adelante con la voluntad de DIOS. A mi madre LIGUIA MONGUI RINCON PEDRAZA gracias mamita por su apoyo incondicional, por creer en mí, por todas esas veces que me acompañó cuando estudiaba por las noches y en especial por el cafecito en las mañanas que me daba con mucho cariño.

A mis HERMANOS gracias por su apoyo y compañía, en especial a mi hermana SANDRA YAJAIRA BAUTISTA RINCÓN por creerme en mí, por sus palabras de apoyo y su admiración durante esta etapa de mi vida.

A mis compañeras y amigas PAULA SUAREZ, ANGELICA DUARTE, CAROLINA ORTIZ por su apoyo, sus palabras de aliento y compañía y en especial a mi amiga y compañera de tesis MARIA LUISA COLOBON PRETEL gracias por el trabajo en equipo que hizo posible

el desarrollo de este proyecto, por la experiencia de aprendizaje durante este tiempo, por persistir siempre, a pesar de los obstáculos que se presentaron nunca desistió.

Infinitas gracias a todos mis familiares, amigos y demás por sus buenos consejos y apoyo,
MUCHAS GRACIAS

Erika Yaraima Bautista Rincón

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que han sido resultado de tu ayuda, y cuando he caído por no creer en mi misma, tú me has abierto los ojos, me has presentado personas a través de ti para animarme y decirme que todo lo que yo me propusiera lo iba a lograr, que yo podía cumplir con mis sueños. Me pusiste muchas veces a prueba para que aprendiera de mis errores y creciera como ser humano y que nunca me ahogara en un vaso de agua y diera todo de mí.

A mi familia por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuenta, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. Le doy inmensas gracias a mi nona CRISTINA por acogerme como una hija y creer siempre en mí. Por aportar un pequeño grano que poco a poco se fue multiplicando.

Quiero también agradecerle cariñosamente a mi pareja sentimental HENRRY MALDONADO por apoyarme en mis momentos de aflicción y darme sus buenos consejos.

A mis queridas compañeras de estudio tras toda la carrera, PAULA SUAREZ, ANGELICA REY, CARO ORTIZ y especialmente a mi compañera de tesis y amiga incondicional ERIKA

BAUTISTA. Gracias por acompañarme, compartir sus conocimientos, su paciencia y comprensibilidad.

María Luisa Colobon Pretel

A nuestra directora de tesis, LILIANA YANETH SUAREZ CONTRERAS por brindarnos su apoyo y conocimiento, especialmente por el tiempo dedicado para la ejecución de este proyecto de investigación.

A LUIS QUINTERO por su tiempo y dedicación, con toda su amabilidad, alegría y nobleza que lo caracteriza, nos enseñó muy pacientemente.

A LADY MORENO por sus consejos y enseñanzas.

A RICARDO ALARCÓN por brindarnos parte de su tiempo, apoyo, y conocimiento en este proyecto de investigación.

MUCHAS GRACIAS.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	19
1. Problema	21
1.1. Título	21
1.2. Planteamiento de problema	21
1.3. Formulación del problema	22
1.4. Justificación	22
1.5. Objetivos	22
1.5.1. Objetivo general	22
1.5.2. Objetivos específicos	23
1.6. Alcances y limitaciones	23
1.6.1 Alcances	23
1.6.2 Limitaciones	23
1.7 Delimitaciones	24
1.7.1 Espacial	24
1.7.2 Temporal	24
1.7.3 Conceptual	24
2. Marco referencial	25
2.1. Antecedentes Bibliográficos.	25

2.2. Marco Teórico	30
2.2.1. Caracterización macroscópica y microscópica	30
2.2.2. Extracción y purificación de ADN	31
2.2.3. Electroforesis en geles de Agarosa.	32
2.2.4. Cuantificación del ADN mediante espectrofotometría.	33
2.2.5. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	33
2.2.6. Secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR	35
2.2.7. Métodos de análisis de una secuenciación	36
2.2.8. Características de los posibles géneros de hongos a analizar	38
2.3. Marco contextual	42
2.4. Marco legal	43
3. Metodología	45
3.1 Tipo de investigación	45
3.2 Población y muestra	45
3.2.1 Población	45
3.2.2 Muestra	45
3.2.3 Hipótesis	45
3.2.4 Variables	45
3.3. Fases de la investigación	46
3.3.1. Reactivación y purificación de las cepas.	46

3.3.2. Caracterización microscópica de los géneros de <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., y <i>Aspergillus</i> sp.	49
3.3.3. Extracción y purificación de ADN fúngico.	50
3.3.4. PCR y amplificación	54
3.3.5. Secuenciación	54
4. Discusión y resultados	55
4.1 Obtención de cultivos puros de <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., y <i>Aspergillus</i> sp.	55
4.2 Descripción macroscópica y microscópica	60
4.2.1 <i>Rhizopus</i> sp.	60
4.2.2 <i>Aspergillus</i> sp.	62
4.2.3 <i>Aspergillus</i> sp.	63
4.2.4 <i>Aspergillus</i> sp.	65
4.2.5. <i>Paecilomyces</i> sp.	66
4.2.6. <i>Aspergillus</i> sp	67
4.2.7 <i>Aspergillus</i> sp.	68
4.2.8 <i>Penicillium</i> sp.	70
4.2.9 <i>Aspergillus</i> sp.	71
4.2.9.1 <i>Penicillium</i> sp	73

4.3 Siembra de <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., y <i>Aspergillus</i> sp., en caldo Sabouraud.	74
4.4 Extracción y verificación del ADN <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., y <i>Aspergillus</i> sp.	74
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	77
4.6. Secuenciación de los fragmentos ITS y comparación de secuencias en BLAST	79
Conclusiones	83
Recomendaciones	84
Referencias bibliográficas	85
Anexos	93