



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES**

**TEMA:**

Determinar la eficiencia de transformación genética mediante el método químico y método físico (Electroporación) a través de la bacteria *Escherichia coli*.

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROPECUARIA**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Línea 2. Ambiente y Biodiversidad

Sub línea 2.1. Recursos Genéticos

**AUTOR:**

JHOSELYN YOLANDA MORENO TERAN

**ASESOR:**

MGS. DIEGO JÁUREGUI

**IBARRA, Junio - 2018**



Ibarra, 2018

Mgs. Diego Javier Jáuregui Sierra  
ASESOR

**CERTIFICA:**

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas Ambientales y Zootecnia (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Mgs. DIEGO JAVIER JÁUREGUI SIERRA  
C.C.: 1720282076



## PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

*El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):*

Mgs. Diego Javier Jáuregui Sierra

C.C.:1720282076

M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

Dra. Yadira Fernanda Ordoñez Vivanco


C.C.: 1103764864



## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Jhoselyn Yolanda Moreno Terán, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 2018



(f.).....

Jhoselyn Yolanda Moreno Terán

C.C.: 1003656723



## AUTORÍA

Yo, Jhoselyn Yolanda Moreno Terán, portador de la cédula de ciudadanía N°1003656723, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad de mi autoría y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

(f.).....

Jhoselyn Yolanda Moreno Terán

C.C.: 1003656723



## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo Jhoselyn Yolanda Moreno Terán, con CC: 1003656723, autora del trabajo de grado intitulado: “Determinar la eficiencia de transformación genética mediante el método de Shock térmico y método físico (Electroporación) mediante células de bacteria *Escherichia coli.*”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera Agropecuaria, en la Escuela de Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, (junio del 2018)

(f.) 

Jhoselyn Yolanda Moreno Terán

C.C.: 1003656723



## **DEDICATORIA**

Con mucho cariño dedico este trabajo a mi Familia.

En especial a mi Padre Raúl Moreno quien ha sido siempre un motivo de superación, lucha, respeto, ya que sin decir nada ha sabido guiarnos y darnos los mejores consejos para ser personas de bien.

Como olvidarme de mi madre Jenny Terán quien es una persona que ha sabido cuidar de sus cuatro hijas con mucho amor y paciencia, enseñándonos a ser personas honestas y humildes.

Como no sentirme orgullosa de tener estos padres que Diosito me dio, los cuales tienen grandes virtudes que nos enseñan a ser personas perseverantes a pesar de los distintos inconvenientes que la vida nos presenta.

Mis hermanas Andrea Moreno, Alfonsina Moreno, Ana Paula Moreno les dedico este trabajo por su apoyo y amor incondicional.

A mi sobrino Milán Aguirre quien es la personita más dulce y noble que tenemos en la familia quien con sus locuras nos alegra y nos hace olvidar los problemas.

Como no dedicarles si ustedes me han dado tanto sin esperar nada a cambio. Este es un pequeño logro que tanto hemos soñado y los retribuyo de esta manera.

Por eso y más les dedico con mucho Cariño.



## AGRADECIMIENTO

Al finalizar este trabajo investigativo tan duro y lleno de inconvenientes quiero expresar mi más grande Agradecimiento a todas aquellas personas quienes han aportado a que se cumpla esta meta.

A Diosito y mi Virgencita de Guadalupe que sin ellos nada de lo que he pasado no se lograría.

Como no agradecer a mis padres Raúl Moreno y Jenny Terán quienes han sabido motivarme de la mejor manera cuando se han presentado inconvenientes.

A mis hermanas quien ha sabido ayudarme en todo momento.

A los Ingeniero Diego Jáuregui y Santiago Mafla quienes fueron una parte fundamental en el desarrollo de este trabajo, sin contar todas las cosas que me han enseñado y la paciencia que han sabido tener, muchas gracias por su apoyo.

Muchas gracias a todos mis docentes quienes han sido un ejemplo a seguir, y han sabido guiarnos y compartir sus conocimientos y experiencias con todos nosotros para que logremos ser profesionales de bien.

A mis amigos que han sido una parte fundamental en esta etapa, con los cuales hemos pasado tantas locuras, risas y tristezas.

A toda mi Familia, Ingenieros, Amigos Muchas Gracias de todo Corazón.

## ÍNDICE CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| 1. RESUMEN .....   | xiv |
| 2. ABSTRAC.....  | xv  |
| 3. INTRODUCCIÓN.....   | 1   |
| 3.1.1. Objetivo General .....  | 3   |
| 3.1.2. Objetivos Específicos .....   | 3   |
| 3.2. VARIABLES .....   | 3   |
| 3.2.1. Variables Independientes .....  | 3   |
| 3.2.2. Variables Dependientes .....  | 3   |
| 3.3. HIPÓTESIS.....  | 4   |
| 4. ESTADO DEL ARTE .....   | 5   |
| 5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....  | 12  |
| 5.1. LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN .....   | 12  |
| 5.2. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS .....   | 12  |
| 5.2.1. Materiales.....   | 12  |
| 5.2.2. Equipos .....   | 13  |
| 5.2.3. Insumos .....   | 13  |
| 5.3. MÉTODO Y CONTROL.....   | 14  |
| 5.3.1. Diseño Experimental.....  | 14  |
| 5.3.2. Tratamientos .....  | 14  |
| 5.3.3. Unidades Experimentales .....   | 14  |
| 5.3.4. Variables e Indicadores.....  | 14  |
| 5.3.5. Preparación del Ensayo.....   | 16  |
| 3. Al término de los treinta minutos, la mezcla se colocó en el calentador de bloque de laboratorio digital / de mesa / para tubos accublock, por 50 segundo. Este calentado debe encontrarse a 42 °C..... | 20  |
| 5.3.6. Método de Control .....   | 22  |
| 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES.....   | 24  |
| 6.1. Estandarizar el protocolo de los métodos de transformación celular mediante electroporación y shock térmico. ....   | 24  |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 6.2.   | Determinar la eficiencia.....               | 26 |
| 6.2.1. | Colonias por placa .....                    | 27 |
| 6.2.2. | Unidades Formadoras de Colonias (UFC):..... | 30 |
| 6.2.3. | Eficiencia de Transformación Genética:..... | 33 |
| 6.3.   | Resultados de la Socialización .....        | 37 |
| 7.     | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....        | 44 |
| 7.1.   | CONCLUSIONES .....                          | 44 |
| 7.2.   | RECOMENDACIONES .....                       | 45 |
| 8.     | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....            | 47 |
| 9.     | ANEXOS .....                                | 50 |
| 9.1.   | Anexos 1 Socialización.....                 | 50 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. <i>Descripción de los tratamientos usados en la investigación.</i> .....                      | 14 |
| Tabla 2. <i>Descripción variables independientes</i> .....   | 15 |
| Tabla 3. <i>Descripción variables dependientes.</i> .....  | 15 |
| Tabla 4. <i>Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de colonias por placa.</i> .....              | 27 |
| Tabla 5. <i>Rangos Prueba de Kruskal-Wallis Colonias por placas</i> .....                              | 29 |
| Tabla 6. <i>Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de UFC.</i> .....                             | 30 |
| Tabla 7. <i>Rangos Prueba de Kruskal-Wallis UFC</i> .....  | 32 |
| Tabla 8. <i>Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de Eficiencia de transformación.</i><br>..... | 34 |
| Tabla 9. <i>Rangos Prueba de Kruskal-Wallis de Eficiencia de Transformació</i> .....                   | 35 |

## ÍNDICE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <i>Figura 1.</i> Esquema pUC 19 .....  | 7  |
| <i>Figura 2.</i> Presencia de colonias blancas/azules X-gal.....   | 10 |
| <i>Figura 3.</i> Placas con cultivo bacterianos de <i>Escherichia coli</i> . .....   | 26 |
| <i>Figura 4.</i> Residuos de Homogeneidad colonias por placa .....   | 27 |
| <i>Figura 5.</i> Normalidad de cálculo de colonias por placa de Shapiro-Wilk. ....   | 28 |
| <i>Figura 6.</i> Prueba de Kruskal-Wallis- Sumatoria de colonias por placa por cada uno de los tratamientos y repeticiones. .... | 29 |
| <i>Figura 7.</i> Residuos de Homogeneidad de UFC .....   | 31 |
| <i>Figura 8.</i> Normalidad de cálculo de UFC de Shapiro-Wilk.....   | 32 |
| <i>Figura 9.</i> Prueba de Kruskal-Wallis- Sumatoria de UFC por tratamiento y repeticiones. .                                    | 33 |
| <i>Figura 10.</i> Residuos de Homogeneidad de Eficiencia de transformación .....   | 34 |
| <i>Figura 11.</i> Normalidad de cálculo de Eficiencia de Transformación de Shapiro-Wilk. ....                                    | 35 |
| <i>Figura 12.</i> Prueba de Kruskal-Wallis. Eficiencia de Transformación por tratamiento y repeticiones .....                    | 36 |
| <i>Figura 13.</i> Socialización en instalaciones de la PUCE-SI.....  | 37 |
| <i>Figura 14.</i> Representación sobre sala de desarrollo del evento. ....   | 38 |
| <i>Figura 15.</i> Representación sobre material audiovisual utilizado en el evento. ....   | 38 |
| <i>Figura 16.</i> Representación sobre dominio del tema. ....  | 39 |
| <i>Figura 17.</i> Representación sobre dominio del auditorio. ....   | 40 |
| <i>Figura 18.</i> Representación sobre facilidad de expresión del compositor.....  | 40 |
| <i>Figura 19.</i> Representación sobre relevancia de la investigación a la sociedad. ....  | 41 |
| <i>Figura 20.</i> Representación sobre perspectivas para estudios complementarios de la investigación. ....                      | 42 |
| <i>Figura 21.</i> Representación de beneficios actuales y futuros de la investigación .....                                      | 42 |
| <i>Figura 22.</i> Representación cumplimiento de objetivos .....   | 43 |
| <i>Figura 23.</i> Socialización Día 1- Teórico .....   | 50 |
| <i>Figura 24.</i> Socialización Día 2 – Práctico.....  | 50 |
| <i>Figura 25.</i> Encuesta Realizada el día de la socialización.....   | 51 |
| <i>Figura 26.</i> Esquema Protocolo Electroporación.....   | 52 |
| <i>Figura 27.</i> Esquema Protocolo Shock Térmico .....  | 53 |
| <i>Figura 28.</i> Electroporador .....   | 54 |

|   |    |
|---|----|
| <i>Figura 29.</i> Contador de Colonias. ....              | 54 |
| <i>Figura 30.</i> Colonias T1 (Electroporación). ....     | 55 |
| <i>Figura 31.</i> Colonias T2 (Shock Térmico) .....       | 55 |
| <i>Figura 32.</i> Colonias T3 (Células Competentes). .... | 56 |

## 1. RESUMEN

La ingeniería genética es el conjunto de técnicas que aprueba la manipulación del material genético, lo cual permite eliminar características no deseadas y modificar características de acuerdo a la necesidad de la investigación. Esta investigación tiene como objetivo determinar la eficiencia de transformación genética con dos métodos Electroporación y Shock Térmico. Además de estandarizar protocolos de los diferentes métodos en donde se obtenga mayor eficiencia de transformación.

Para ello se estableció tres tratamientos en donde el T1 (Electroporación), T2 (Shock Térmico), T3 (Células competentes). Para determinar la eficiencia de transformación se tomó en cuenta diversas variables como son colonias por placa, unidades formadoras de colonias (UFC) y Eficiencia de transformación (E.T.). En donde se efectuó con ayuda de cálculos matemáticos y así determinando UFC y E.T. de esta manera proporcionando como resultado que el T1 (Electroporación) es el método más eficiente de transformación, obteniendo mejores resultados en comparación del T2 (Shock Térmico) y T3 (Células competente), con respecto al número de colonias por placa (506), UFC (5060) y una Eficiencia de Transformación ( $1.265 \times 10^{11}$ ) U.

De esta manera comprobando que la hipótesis planteada T1 (Electroporación) es el método más eficiente de transformación obteniendo mejores resultados en comparación a los otros tratamientos.

**Palabras clave:** *Electroporación, Shock Térmico, Eficiencia de transformación, UFC.*

## 2. ABSTRAC

Genetic engineering is the set of techniques that approve the manipulation of genetic material, which allows to eliminate unwanted characteristics and modify characteristics according to the need of research. This research aims to determine the efficiency of genetic transformation with two methods Electroporation and Thermal Shock. In addition to standardizing protocols of the different methods where greater transformation efficiency is obtained.

For this, three treatments were established in which the T1 (Electroporation), T2 (Thermal Shock), T3 (Competent cells). To determine the transformation efficiency, several variables were taken into account, such as colonies per plate, colony forming units (CFU) and transformation efficiency (E.T.). Where it was made with the help of mathematical calculations and thus determining UFC and E.T. in this way, providing as a result that T1 (Electroporation) is the most efficient method of transformation, obtaining better results compared to T2 (Thermal Shock) and T3 (Competent cells), with respect to the number of colonies per plate (506), UFC (5060) and a Transformation Efficiency ( $1.265 \times 10^{11}$ ) U.

In this way, checking that the proposed hypothesis T1 (Electroporation) is the most efficient method of transformation, obtaining better results in comparison with the other treatments.

**Key Words:** *Electroporation, Thermal Shock, Transformation Efficiency, UFC.*

### 3. INTRODUCCIÓN

El aumento progresivo de la población, hace que cada día se necesita de mayor cantidad de insumos los cuales ayudan a mejorar la calidad de vida de las personas (Mussin, 2006), es por ello que la ingeniería genética se ha enfocado en la manipulación del material genético (ADN) el cual permite la obtención de productos que proveen de beneficios a las personas mejorando así su estilo de vida (Ramil, 2011), entre las industrias en las que se enfoca la ingeniería genética son:

- Industria Agrícola y Ganadera
- Industria Farmacéutica
- Industria de la Medicina
- Medio Ambiente

A partir de la crisis, por demanda de insumos se impulsó a buscar alternativas las cuales permitan tener la obtención de productos en mayor producción, menor tiempo, mejor calidad, y sin necesidad de la utilización de gran cantidad de recursos.

Mediante la técnica de manipulación genética se hace uso de la ingeniería genética la cual permite la obtención de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), los cuales se caracterizan por ser acordes a las necesidades de las personas, es así que para la obtención de un OGM, es necesario identificar la célula huésped y el gen de interés (Mussin, 2006).

Para lograr un OGM, es importante tener en cuenta que la célula huésped debe transformarse, lo cual se logra cuando el gen de interés ingresa a la célula, y posteriormente se exprese con las características requeridas (Perera J, Tormo A, García J, 2002).

La inserción de gen a la célula huésped es mediante diferentes métodos como son de Electroporación y Shock Térmico, los cuales permeabilizan la membrana de la célula permitiendo el ingreso del ADN foráneo (Francés, 2006).

Villalobos (2008) manifiesta que el método de Electroporación es la aplicación de impulsos eléctricos a la célula, los cuales producen una serie de poros o pequeños agujeros en la membrana por donde permite el ingreso del ADN.

El método de Shock Térmico Quintana (2009) exterioriza que el cambio de temperatura en la célula provoca un cambio transitorio en la permeabilidad de la membrana facilitando la entrada de ADN foráneo.

En los métodos ya mencionados existen diversos problemas, los cuales influyen en la eficiencia de transformación, los cuales son ocasionados porque no existe un protocolo, el cual estandarice la manipulación correcta de los de los equipos e insumos.

Entre los problemas más comunes es la inadecuada manipulación de las células y gen de interés, sabiendo que estos son muy sensibles a cambios de temperatura, movimientos bruscos, etcétera. De esta forma ocasionando su degradación y por ende la muerte, minimizando así la eficiencia de transformación (Granados C, Chaparro A, 2012. Por otro lado la inadecuada manipulación de los genes puede ocasionar que existan mutaciones entre ellos, lo cual contribuye al silenciamiento del gen, y así evitando que se exprese (Yi & Kuipers, 2017).

El inadecuado uso del equipo de electroporación, es uno de los problemas comunes en la transformación ya que no se calibra de acuerdo a la célula que se va a usar, y se puede colocar impulsos muy fuertes, por mucho tiempo, a altos voltajes, lo cual no resistiría la célula expuesta ocasionando su muerte (Barbón R, Jiménez E, Capote A, Gil V, Ocaña A, 2011). Es por ello que se debe estudiar a fondo las características de la célula que se va a trabajar.

Un papel primordial toma el buffer o tampón Electrolytic, ya que gracias a esta sustancia permite el intercambio iónico de partículas (Yi & Kuipers, 2017), en donde su composición es la que determina la intensidad de los impulsos los cuales son provocados por el electroporador (Hu, Do, & Yu, 1992).

Hernández y Martínez (2012) argumentan que el método de Electroporación, es un método eficiente logrando una transformación de  $10^9$ U a  $10^{10}$ U, con una expresión del 90%, considerándolo como un método eficiente.

### **3.1. OBJETIVOS**

#### **3.1.1. Objetivo General**

Determinar la eficiencia de transformación genética mediante el método de químico y el método físico de electroformación con el uso de células de la bacteria *Escherichia coli* con el fin de obtener una mejor transformación bacteriana.

#### **3.1.2. Objetivos Específicos**

- Estandarizar el protocolo de los métodos para la transformación celular mediante la electroporación y shock térmico con el fin de mejorar la eficiencia de transformación.
- Cuantificar las células transformadas mediante cálculos de colonias para determinar así su eficiencia.
- Socializar los resultados obtenidos mediante una charla a las personas interesadas con el fin de dar a conocer los resultados de la investigación.

### **3.2. VARIABLES**

#### **3.2.1. Variables Independientes**

- Método de Electroporación
- Método Shock Térmico
- Testigo

#### **3.2.2. Variables Dependientes**

- UFC Unidades formadoras de colonias transformadas.

- Eficiencia de transformación de las células

### **3.3. HIPÓTESIS**

Mediante el Tratamiento 1 Electroporación se puede obtener una mejor eficiencia de transformación genética.

#### 4. ESTADO DEL ARTE

Mussin (2006) manifiesta que con el comienzo de la agricultura, ganadería e industrialización intensiva, ha tomado como alternativa la ingeniería genética de forma selectiva, con el fin de obtener beneficios alimentarios o industriales (fabricación de útiles, medicinal, ornamental, textil, etc). Es por ello que el hombre ha buscado opciones las cuales proporcionen mejores beneficios. Para ello se ha seleccionado especies vegetales y animales de mayor interés las cuales proporcionen mejor rendimiento, calidad nutritiva, resistente a factores físicos o biológicos (Francés, 2006).

Por ello que se ha enfocado en la ingeniería genética, obteniendo especies modificadas que ayudan a disminuir pérdidas por bajos rendimiento, por plagas y enfermedades, y así reduciendo costos de producción (Ramil, 2011).

La ingeniería genética es una técnicas que permite la manipulación del material genético, Según Buitrago (2015) material genético es la información hereditaria conocido como Ácido desoxirribonucleico (ADN) y permitiendo la recombinación con diferentes genes originando nuevos organismos con diferentes características que el original, y por ellos son conocidos como organismos genéticamente modificados (OGM) (Villalobos, 2008).

Los OMG tienen el fin de tomar un gen de interés de una especie en particular e introducirle a otro organismo diferente (Spendeler, 2005). Lo que permite modificar las características hereditarias de un organismo de una forma benéfica al hombre, alterando su material genético. En el proceso puede utilizarse células procariotas como bacterias o células eucariotas como vegetales o animales (Almeida, 2010).

Para la obtención de un OMG es necesario identificar la célula huésped y el gen de interés, los cuales se encuentren aptos para ser transformados (Satorre, 2005).

Para extraer el gen o material genético de interés es de mucha importancia estudiarlo a fondo y así lograr identificar su estructura y formación en donde se encuentre sus funciones y

características, y de esta manera permitiendo aislarlos, analizarlos y modificarlos (Aguirre, Acosta, & Paredes, 2007).

Es importante tener en cuenta que el gen no puede estar de forma libre, es por ello que se encuentra en un vector o plásmido, el cual es un vehículo que le permite ingresar sin problemas al interior de la célula huésped (Articoli, 2015).

El Vector o plásmido son pequeños círculos que contienen el material genético o ADN (Brown, 2006), existen dos tipos de vectores, el vector de clonación y de expresión.

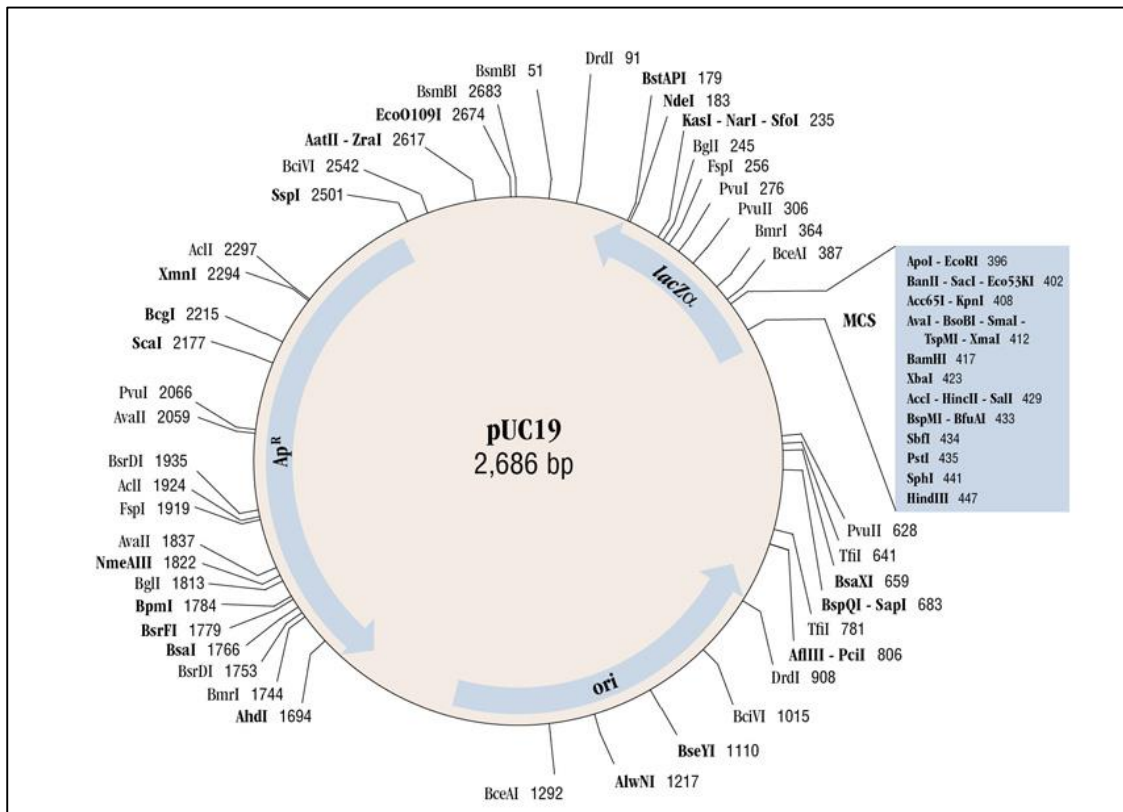
El vector de clonación son moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN, como su nombre mismo lo dice es aquel que realiza copias idénticas de su vector inicial el cual no expresa su gen interno, permitiendo de esta manera adoptar la función de guarda reservas del gen (Jones, Miller, & Brown, 2017).

Vector de expresión es aquel que permite expresar las secuencias clonadas, así expresando todas aquellas características de interés que se introdujo en el vector (Almeida, 2010).

Este plásmido cuenta con ciertas características especiales como puede ser resistencia a antibióticos, arsénico, cromo, etcétera. Estas características especiales se las incorpora de acuerdo a la necesidad de la persona encargada en la investigación (Alvarés, 2005).

Este plásmido presenta diferentes zonas las cuales son:

- Presenta un Origen de Replicación la cual es una secuencia de ADN, en donde la bacteria puede realizar varias copias del plásmido.
- Lugar múltiple de clonación, es el sitio en donde se almacena diferentes enzimas de restricción, en donde da lugar a introducir genes específicos.
- Promotor es donde se da lugar a codificar el gen.
- Marcador selectivo, lugar donde codifica resistencia a un antibiótico (Godiska, Patterson, Schoenfeld, & Mead, 2005).



**Figura 1.** Esquema pUC 19

**Fuente.** (BioLabs, 2014)

El plásmido que se usó en la investigación es un plásmido de clonación y expresión (pUC 19) el cual cuenta con 2686 pares de base, su origen de replicación es pMB1, el lugar de múltiple clonación se encuentra en el gen lacZα, este plásmido presenta resistencia al antibiótico (Ampicilina) (BioLabs, 2014).

Este plásmido para que logre transformarse debe ingresar a la célula huésped, la célula bacteriana de uso más común para la transformación es la bacteria gram negativa *Escherichia coli* (Stanley, Annie, & Hsu, 1972), la cual es atractiva por su fácil uso, adaptación y tienen la capacidad de reproducirse con gran velocidad (García, Calzada, Rivero, 2012). Cabe recalcar que *Escherichia coli* es una bacteria que la encontramos en el sistema digestivo del hombre y animales, la cual para ser usada para transformación genética debe encontrarse en estado competente (Rodríguez, 2002).

El estado de competencia es la capacidad de la célula bacteriana de introducir el ADN foráneo (Betancor, Gadea, & Flores, 2015). El estado de competencia de las células bacterianas se puede lograr mediante procesos físicos o químicos (Galván, Tejada, Camargo, Higuera, & Reyes, 20014).

La transformación genética se induce a partir del contacto entre la célula que porta el gen de interés en su plásmido, en donde el ADN es transportado desde la célula bacteriana donde se integra a su material genético. Luego de la transformación, es cultivado en un medio con que contenga antibióticos en donde sólo las células transformadas son las que sobreviven.

Mediante esta técnica de transformación actualmente se producen muchas proteínas que son usadas en el tratamiento de algunas enfermedades humanas como la diabetes, al producir hormonas humanas como la insulina, la hormona de crecimiento y antibióticos siendo este el caso de la industria farmacéutica y médica. Y en el caso de la industria agropecuaria la obtención de plantas mejoradas genéticamente, los cuales proporcionen beneficios a los agricultores, en el caso pecuario encontramos ganado (vacas) que proporcionen mayor cantidad de leche con mejor calidad, resistencia a enfermedades como es el caso de la mastitis, de esta manera la ingeniería genética y la técnica de transformación aportan positivamente a la sociedad (Betancor Gadea, 2008).

Para que podamos lograr una transformación exitosa, existen diferentes técnicas las cuales ayudan a que el gen de interés ingrese a la célula, entre ellas encontramos:

- Shock Térmico
- Electroporación
- Infección con *Agrobacterium*
- Micro inyección
- Método químico
- Biolística

Entre las técnicas más comunes son la de Electroporación y Shock Térmico.

Electroporación es una técnica que permite permeabilizar la membrana de la célula ocasionando pequeños poros por donde permite el ingreso de plásmido (Francés, 2006).

Durante la electroporación, las células son tratadas con impulsos eléctricos controlados de bajo y alto voltaje que varían de 500V a 5000V, 1 a 6 pulsos por una duración de milisegundos que puede ser de 1 a 100ms (Invitrogen, Neon Transfection System, 2014).

Existen diferentes tipos de dispositivos que se usa para la electroporación, entre ellos se encuentra el dispositivo Neon Transfection System el cual se usa para transformar células bacterianas con el 90% de eficiencia (Invitrogen, Neon Transfection System, 2014).

Otra técnica muy usada es el Shock Térmico que fue descubierto en el 1970 por Mendel e Higa, es un técnica que desde hace muchos años atrás hasta la actualidad es usada con mucha frecuencia (Rivero, García, & Calzada, 2013). Esta técnica tiene la característica de realizar cambios bruscos de temperatura, afecta a la membrana de la célula ocasionando unos pequeños poros o agujeros y así permitiendo el ingreso del ADN foráneo. Estos poros se presentan con el aumento de temperatura (42°C) de 50 segundo y se cierran o se contraen con bajas temperaturas (1 a 4 °C) por 30 minutos (León & Matalonga, 2012).

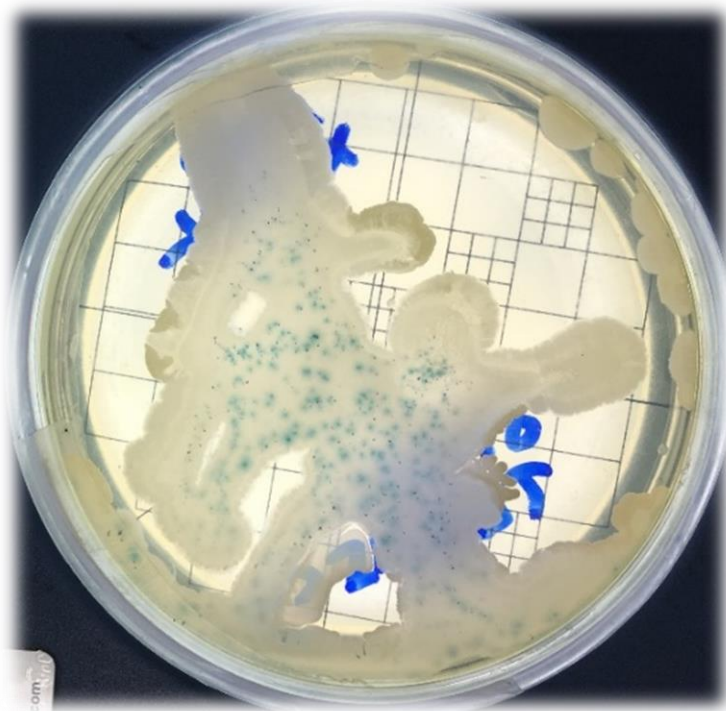
Las células con el plásmido al momento de realizar las transformación son sometidos a stress, por ello es necesario usar un restablecedor, el cual permite que las células se adapten a estas condiciones, es por ello que se coloca medio Super optimal broth (S.O.C) el cual es una sustancia que se usa en la parte final de la transformación, ayudando a mejorar la eficiencia de transformación y por otro lado proporciona nutrientes a las bacterias, entre los nutrientes que proporciona son: Triptona, Extracto de levadura, Cloruro de sodio, Cloruro de Potasio, Cloruro de Magnesio, Sulfato de magnesio y Glucosa (Invitrogen, Medium S.O.C, 2012).

Para determinar si el ADN foráneo se ha introducido correctamente a la bacteria es necesario medir la eficiencia de transformación lo cual permite cuantificar el número de UFC o células transformadas, las cuales deben expresarse con las características requeridas, estas bacterias al ser transformadas deben crecer en un medio en donde contenga el antibiótico - Ampicilina (Stephenson, 2010).

Para poder determinar si las células se han transformado existen diversos métodos los cuales facilitan verificar y contabilizar el porcentaje de transformación para ello existe un histoquímica llamado X-GAL que contiene bromo, cloro, indolil y  $\beta$ -galactopiranosido, el cual permite detectar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, esta es detectada cuando el ADN del plásmido se une a la región LacZ del plásmido, y de esta manera expresándose presentando colonias de diferentes colores Blancas/Azules como indica la figura 2 (Aldrinch, 2014).

Este Histoquímica X-gal actúa de diferentes maneras de acuerdo a la inserción del plásmido (Granados C, Chaparro A, 2012):

- Cuando están colonias de color blanco, indica que el plásmido ha ingresado a la célula y se ha recombinado. Esta es una célula transformada correctamente.
- Cuando presenta colonias de color azul, indica que el plásmido ha ingresado a la célula pero no se ha recombinado.
- Cuando en las placas con ampicilina no ha crecido nada, indica que no se ha transformado las células (Uptima, 2015).



**Figura 2.** Presencia de colonias blancas/azules X-gal

Estas técnicas de transformación son el paso primordial para el mejoramiento genético (Zhao, y otros, 2017), el cual tienen como objetivo la incorporación de material genético extraño a una célula (Procariota, Eucariota), el cual no altera sus características propias, por el contrario las mejora y obtiene beneficios para la sociedad, ya sea en distintas industrias como la agrícola, pecuaria, farmacéutica o ambiental (Díaz & Chaparro, 2012).

Para determinar si el gen de interés ingreso a la célula es importante definir la eficiencia de transformación y esto se lo realiza, contabilizado el número de bacterias transformadas, las cuales han adquirido el plásmido o es una transformación eficiente aquellas células viables, las cuales tengan la capacidad de replicarse (Martini, 2016).

Se han perfeccionado varios métodos de transformación con el objetivo de mejorar la eficiencia de transformación, en donde el método que se maneja con más frecuencia es el de infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Ramírez & Veitía, 2013), el cual es un método sencillo de manejar pero su problema es la baja eficiencia, es por ello que se toma como alternativa el método de electroporación en donde se obtiene como resultado un eficiencia superior al método anteriormente mencionado (Granados & Giraldo, 2012).

## **5. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **5.1.LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se realizó en las instalaciones de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, la cual está ubicada en la provincia de Imbabura, cantón de Ibarra, parroquia Sagrario, lo cual se desarrolló en los distintos laboratorios de las instalaciones (Biotecnología y Microbiología).

### **5.2. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS**

#### **5.2.1. Materiales**

- Cajas Petri
- Frasco Boeco
- Probeta
- Tubos de ensayo
- Mechero de busmen
- Vaso de precipitación
- Tubos falcom
- Tubos de eppendorf
- Puntas de 1-10ul
- Puntas de 10-100ul
- Puntas de 100 – 1000ul
- Cubers de hielo
- Porta Objetos
- Cubre Objetos
- Termómetro
- Cristal violeta
- Safranina
- Lugol

- Alcohol
- Asa bacteriológica
- Guantes
- Mandil

### **5.2.2. Equipos**

- Balanza ADAM ®
- Cámara de Flujo Laminar N\_BIOTEK®
- Incubadora Shaking NB-205L N\_BIOTEK®
- Congelador (Thermoscientific™)
- Contador de colonias BioCote SC6PLUS
- Autoclave ican CLAVE
- Incubadora (Thermo Scientific™)
- Neon Transfection System (Thermo Scientific™)
- Calentador de bloque de laboratorio digital / de mesa / para tubos accublock™
- Micro centrifuga 6000 rpm (2000 x g) 110v prism.
- Tanque de Nitrógeno

### **5.2.3. Insumos**

- One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli (Thermo Scientific™)
- One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. coli (Thermo Scientific™)
- Super optimal broth (S.O.C.) Medium (Thermo Scientific™)
- X-Gal (Thermo Scientific™)
- Ampibex 250 mg Ampicilina (life)
- BD® LB Agar, Miller (Luria-Bertani)
- Gibco LB Broth, Liquid
- Agua destilada
- Agua destilada esterilizada

## 5.3.MÉTODO Y CONTROL

### 5.3.1. Diseño Experimental

Para la presente investigación se usó un Diseño Experimental Completamente al Azar con nueve unidades experimentales, tres tratamientos y tres repeticiones.

En las unidades experimentales se realizó la transformación genética de bacterias mediante dos métodos Shock Térmico y Electroporación, de los cuales se determinó la eficiencia de transformación realizando conteo de colonias.

### 5.3.2. Tratamientos

La distribución de los diferentes tratamientos se la realizo como se detalla en la (Tabla1).

**Tabla 1.** Descripción de los tratamientos usados en la investigación.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Descripción</b>        |
|--------------------|---------------------------|
| Tratamiento 1 (T1) | Método de Electroporación |
| Tratamiento 2 (T2) | Método de Shock Térmico   |
| Tratamiento 3 (T3) | Células competentes       |

### 5.3.3. Unidades Experimentales

Para cada uno de los tratamientos se realizó tres repeticiones obteniendo un total de nueve unidades experimentales. En donde cada unidad experimental corresponde a una caja Petri la cual cuenta con 20 ml de Agar LB, obteniendo un total de nueve unidades.

### 5.3.4. Variables e Indicadores

En el desarrollo de la investigación se evaluó variables independientes y dependientes, las cuales proporcionaron resultados de la investigación como se detalla en la (Tabla 2 y 3).

### 5.3.4.1. Variables Independientes

**Tabla 2.** Descripción variables independientes

| Variable Independiente   | Unidades   |
|--------------------------|--|
| T1 (Electroporación)     | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Voltaje</li><li>▪ Tiempo</li><li>▪ Pulsaciones</li></ul> |
| T2 (Shock Térmico)       | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Temperatura</li><li>▪ Tiempo</li></ul>                   |
| T3 (Células competentes) | La célula no se somete a ningún tipo de estrés.  |

### 5.3.4.2. Variables Dependientes

**Tabla 3.** Descripción variables dependientes.

| Variable Dependiente            | Unidades |
|---------------------------------|----------|
| Unidades formadoras de Colonias | UFC      |
| Eficiencia de transformación    | %        |

- **Unidades formadoras de Colonias (UFC)**

Esta técnica tiene el objetivo de contabilizar las UFC por cada mililitro o gramo por muestra, la cual se obtiene de un medio selectivo y se la determina de acuerdo a su temperatura y tiempo de incubación (Camacho, y otros, 2009).

Esta variable se calcula con la ayuda de la fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\# Colonias \times FDD}{Volumen inicial sembrado}$$

- UFC: Unidades Formadoras de Colonias

- ml: Mililitro
- # Colonias
- FDD: Factor Decimal de Dilución
- Volumen inicial sembrado

- **Eficiencia de transformación**

Para determinar la eficiencia de transformación en los diferentes métodos Shock Térmico y Electroporación se realizó mediante cálculos, haciendo uso de fórmulas como:

$$\frac{\# \text{ colonias}}{10\text{pg ADN transformado}} \times \frac{10^6 \text{pg}}{\text{ug}} \times \frac{\text{Total transformado}}{\text{x ul plato}} \times 10 = \frac{\# \text{ transformado}}{\text{ug ADN plasmido}}$$

(Invitrogen, One Shot® TOP10 Competent Cells, 2013)

- # Colonias
- 10 Picogramos (pg) ADN transformado
- Total Transformado: Cantidad que se ha transformado
- x Microlitro (ul) plato: cantidad de agar puesto por plato
- # transformado
- Microgramo (ug) ADN plásmido: cantidad de plásmido usado para la transformación

### 5.3.5. Preparación del Ensayo

Para determinar las variables dependientes y obtener resultados de la presente investigación se realizó el proceso que se describe a continuación:

#### Antes de realizar la transformación

1. Se preparó Agar LB BD® LB Agar, Miller (Luria-Bertani) el cual proporciona los nutrientes necesarios para mantener y alargar la vida de las bacterias *Escherichia coli*.

El Agar LB se prepara:

40g por cada 1000ml.

Dependiendo la cantidad que se quiera preparar se calcula la cantidad de agar que se usará. Es importante que la mezcla sea esterilizada, para eliminar la presencia de microorganismos y por otro lado que la mezcla quede homogénea.

Cajas petri, probeta y demás materiales a usar deben ser esterilizados.

2. Esterilizar todos los materiales e insumos en el Autoclave ican CLAVE, al finalizar la esterilización se llevó a la Cámara de Flujo Laminar N\_BIOTEK® en donde previamente se había aseado.
3. Al momento que el agar se enfrió se procedió a colocar el antibiótico (Ampicilina). Se debe colocar 100ul por cada ml de agar.

El Ampibex 250 mg Ampicilina que se usó en la investigación tiene una concentración de 250,000mol.

La cantidad de ampicilina a colocar, se calcula con el uso de la siguiente formula (Ayala, s.f.):

$$\text{Concentración1} * \text{Volumen1} = \text{Concentración2} * \text{Volumen 2}$$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

4. Posteriormente se dispensó el Agar LB BD® LB Agar, Miller (Luria-Bertani) con la ampicilina en las cajas Petri, se añade 20 ml por cada una de las placas.
5. Cuando el Agar se encuentra en estado sólido, se procedió a agregar en cada una de las placas 40 ul de X-gal y se deja incubar por una hora a 37 °C.

El X-Gal (Thermo Scientific™) de invitrogen viene una cantidad de 100mg, del cual se realiza una solución madre en donde se colocó:

40mg en un ml de agua destilada estéril.

6. Es importante a las células competentes que se encuentran a menos ochenta grados centígrados se aumente gradualmente la temperatura hasta que las células se encuentren en estado líquido, y de esta manera no estresarlas y así evitando su degradación y muerte.

### **Método Físico Electroporación**

Para la transformación por Electroporación se usó el equipo Neon Transfection System (Thermo Scientific™) el cual es un dispositivo que se usó para realizar la investigación.

1. Con ayuda de una pipeta se tomó 20 ul de células competentes y 5 ul de plásmido y se colocó en un tubo de eppendorf de 10 a 100 ul.
2. Esta mezcla de células con el plásmido se colocó por unos segundo (5 a 10 segundos) en la micro centrifuga, en donde permitió que se mezcle uniformemente.
3. Esta mezcla se la deja por 2 minutos en hielo.
4. Mientras que la mezcla de plásmido y células competentes se encuentre en hielo, se procede a encender el equipo para la electroporación Neon Device (Dispositivo), en donde se calibro el voltaje, la anchura del voltaje (milisegundos) y las pulsaciones.

Para las células bacterianas de *Escherichia Coli* el equipo Neon Transfection System, se lo calibra con las siguientes características.

- Voltios: 2500v
- Milisegundos: 4ms
- Pulsaciones: 2

Estos datos se lo obtuvieron mediante varios ensayos en los cuales se probó a diferentes voltios, tiempo y pulsaciones, y se determinó que estos son los valores en los cuales existe mayor eficiencia de transformación.

5. Luego procedió a conectar el Neon Pipette Station al Neon Device para que se pueda transferir los impulsos eléctricos.

6. Se tomó la Neon Tube (Cubeta) en donde se colocó 3ml de Electrolytic Buffer (tampón electrolítico).

Es importante que Neon Tube y Electrolytic Buffer se encuentre a baja temperatura (1 a 3 °C), y de esta manera permite que la mezcla no sufra de estrés por aumento de temperatura (Invitrogen, Neon Transfection System, 2014).

7. Cuando el Neon Tube ya se encuentra con Electrolytic Buffer procedió a colocar en la estación (Neon Pipette Station).

8. Con uso de Neon Pipette y Neon Tips de 10ul se tomó la mezcla, es importante que al momento de introducir la mezcla al Neon Tips no existan burbujas o espacios de aire presentes, ya que esto impide que la mezcla se electropore.

9. Se colocó la Neon Pipette en el Neon Pipette Station y procedimos a iniciar el proceso de electroporación.

Este proceso tardará unos segundos, esperamos que en el dispositivo diga proceso completo y podemos sacar la Neon Pipette.

10. La mezcla transformada se colocó en un tubo falcon y conjuntamente con esta mezcla colocamos 1ml de S.O.C.

Es importante que el S.O.C se encuentre a una temperaturas (1 a 4°C), ya que de esta manera no realizamos cambios de temperatura en la mezcla, y así evitando un estrés extra en las células y plásmido.

11. Se colocó el tubo falcon en Incubadora Shaking NB-205L N\_BIOTEK® a 37 °C, 50rpm, por una hora.

12. Después de la hora transcurrida en la Incubadora Shaking NB-205L N\_BIOTEK® se procedió a dispensar la mezcla en las cajas petri.

En cada una de las cajas petri se colocó 300 ul de la mezcla.

13. A las cajas Petri ya con la mezcla electroporada se las selló con parafilm así evitando la contaminación de posibles patógenos.

14. A estas cajas petri se las dejó por dos a tres días para poder observar el desarrollo de colonias blancas y azules.

A las cajas petri se las dejó en la Incubadora (Thermo Scientific™) a 37 °C la cual una temperatura óptima para el desarrollo de estas bacterias ya transformadas.

### **Método de Shock Térmico**

El método de Shock térmico es el cambio de temperatura de baja (1 a 4 °C) a alta (42 °C) permitiendo que el plásmido o ADN foráneo ingrese.

1. Se tomó 20 ul de células competentes conjuntamente se toma 5 ul de plásmido y se coloca en un tubo de eppendorf.
2. La mezcla con las células con el plásmido se colocó en el congelador (Thermoscientific™) la cual lo dejamos por treinta minutos. Este congelado se encuentra a -30 °C.
3. Al término de los treinta minutos, la mezcla se colocó en el calentador de bloque de laboratorio digital / de mesa / para tubos accublock, por 50 segundo. Este calentado debe encontrarse a 42 °C.
4. Al término de los 50 segundo devolvimos la mezcla al congelador (Thermoscientific™) por 10 minutos.

5. Transcurrido este tiempo se colocó 250ul de S.O.C en el tubo de eppendorf, y a esta mezcla la colocamos en la incubadora (Thermo Scientific™) por una hora a 37 °C.
6. Después de la hora en la incubadora (Thermo Scientific™) se procedió a dispensar la mezcla en las cajas petri.

En cada una de las cajas petri se colocó de 70– 100ul de la mezcla.

7. A las cajas Petri con la mezcla se las sello con parafilm para que evitar la contaminación de posibles patógenos.
8. Las cajas petri se dejó por uno a tres días y así poder observar las colonias blancas y azules.

Estas cajas se debe dejar en la incubadora (Thermo Scientific™) a 37°C, para que se encuentre en una temperatura óptima para el correcto desarrollo de estas bacterias.

### **Después de la transformación**

1. Al término de los tres días se pudo observar las colonias presentes en cada una de las cajas petri, y se lo realizó con ayuda de un contador de colonias BioCote SC6PLUS, en donde se pudo identificar colonias de color blanco y azul, así permitiendo contabilizar las colonias para realizar los diferentes cálculos.
2. Para poder mantener o guardar estas células transformadas, procedimos a extraer una muestra de cada una de ellas y las cultivamos en caldos nutritivos. El proceso se lo detalla a continuación:
  - Preparar caldo LB.

24g por cada 1000ml

- Se colocó en tubos de ensayo, y se autoclavó.
- Esperamos hasta que los tubos con el caldo se encuentren a una temperatura que sea soportable, y procedemos a colocar ampicilina.

La cantidad de ampicilina depende de la cantidad de caldo que se ha colocado.

$$\text{Concentración1} * \text{Volumen1} = \text{Concentración2} * \text{Volumen 2}$$

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$$

**Nota:** Se coloca ampicilina como un medio de verificación de que se ha transformado la bacteria.

- En cada uno de los tubos se siembra una colonia, y dejamos por 24 horas a 37°C.

### **5.3.6. Método de Control**

Este método de control lo realizamos para verificar que las células competentes no se encuentren contaminadas o exista otro tipo de bacterias.

En este caso las bacterias a transformar es *Escherichia Coli*, la cual es una bacteria Gram Negativa, y para ello se realizó una tinción Gram, en donde las bacterias Gram Negativas se tiñen de color rosáceo o medio anaranjado.

#### **5.3.6.1. Tinción Gram**

1. Como primer paso se tomó una colonia de las cajas petri y se coló en el porta objetos, se realizó un frotis con ayuda de una aza, y sellamos con calor (Mechero de Busen).

2. Ya con la colonia sellada colocamos una gota de cristal violeta y lo dejamos por un minuto. Después del minuto lavamos con agua destilada.
3. Posteriormente colocamos una gota de lugol y dejamos por un minuto. Lavamos con agua destilada.
4. Proseguimos y colocamos una gota de alcohol y dejamos por treinta segundos. Lavamos con agua destilada.
5. Finalmente colocamos una gota de safranina dejamos por un minutos. Lavamos con agua destilada. Limpiamos los excesos, y secamos con ayuda de calor. Proseguimos a observar (López, y otros, 2014).

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para analizar los diferentes resultados, se lo realizó según los objetivos planteados los cuales fueron desarrollados a lo largo de la investigación. Los cuales si los representa a continuación:

### **6.1. Estandarizar el protocolo de los métodos de transformación celular mediante electroporación y shock térmico.**

En el transcurso de la investigación se realizó análisis en donde se logró estandarizar los diferentes protocolos con los cuales se obtiene mayor eficiencias de transformación. Los protocolos de Electroporación y Shock Térmico se los describe en los siguientes esquemas de los (Anexos 26, 27).

Invitrogen (2010) nos da a conocer un protocolo el cual se ha seguido paso a paso, pero se ha realizado varias modificaciones, las cuales han mejorado la eficiencia de transformación de los diferentes métodos.

Entre las modificaciones realizadas son:

- Al momento que se tenga la mezcla de células con plásmido en el tubo de eppendorf, es importante pasar por la micro centrifuga por 10 segundos en los dos tratamientos (Electroporación y Shock Térmico).
- En el método de Electroporación incubar las células transformadas con movimiento a 50rpm por una hora a 37°C, este movimiento permiten que las células se aclimaten debido al estrés ocasionado por el alto voltaje.
- Esperar de 48 a 72 horas para observar la presencia de colonias en el caso de Electroporación y Shock Térmico.
- En el método de Shock Térmico no es necesario incubar con movimiento las células transformadas, ya que el movimiento puede ocasionar estrés innecesario el cual puede ocasionar muerte de las células o baja eficiencia de transformación.

En el protocolo de Electroporación y Shock Térmico nos indica que las células competentes y plásmido se debe tratar con mucho cuidado ya que los movimientos y cambios de temperatura bruscos pueden ocasionar la muerte de las células y en el caso del plásmido que se degrade y pierda eficiencia en cuanto a la transformación (Espinosa, 2012).

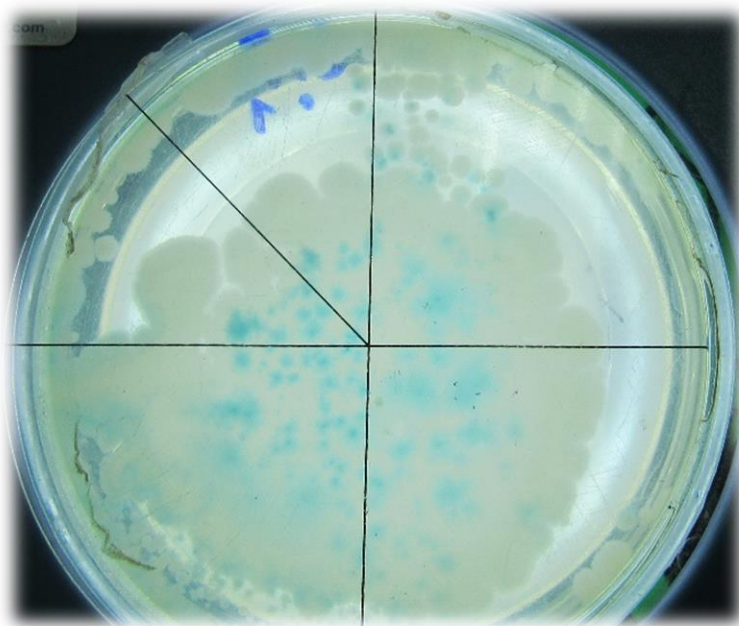
Se determinó que con el uso de la mini centrifuga permite que la mezcla (células con el plásmido) sea uniforme y permita que el ADN exógeno ingrese de mejor forma a la célula competente, ya que no basta dar pequeños golpes o pipetear suavemente para que se mezcle correctamente. Así se determinó que la célula competente y plásmido se adaptan a este movimiento brusco y mejora la eficiencia en su transformación.

En el caso de la Electroporación después de ser transformadas las células es importante incubar por una hora a 37 °C lo cual Invitrogen (2013) nos indica que se debe incubar con movimiento a 225rpm, sin embargo, Zhang, Ding, Shu, Luo, Tan (2015) nos indican que se debe incuba a un movimiento de 200rpm, pero en la presente investigación se determinó que no es recomendable que el movimiento sea tan brusco ya que las células son sometidas a altos voltajes lo cual causa alto estrés, es por ello que los movimientos bruscos no son aceptados ya que ocasionan la muerte de las células o baja eficiencia de transformación, por ello se determinó que se debe incubar con movimientos de 50 rpm, obteniendo mejores resultados.

Para realizar la electroporación (Yi & Kuipers, 2017) nos da a conocer que el voltaje usado para la electroporación es de 5000 V, lo cual logró una transformación  $3.4 \times 10^2$  U, al realizar varios ensayos se determinó que el voltaje óptimo para la bacteria *Escherichia coli* es de 2500 V con la cual se obtuvo una eficiencia superior a la de la presente investigación.

En el Caso de Shock Térmico es importante no incubar con movimiento, ya que estas células no son sometidas a estrés extremo como el método de Electroporación, es por ello que en este método de (Shock Térmico) al no tener tanto estrés se debe incubar en la incubadora (Thermo Scientific™), la cual no ocasiona ningún tipo de movimiento innecesario, y así permitiendo el desarrollo y adaptación de la células transformadas.

Al momento de observar las colonias en los diferentes métodos Rivero, García & Calzada (2013) indica que se debe esperar un lapso de tiempo de 24 horas para poder observar la presencia de colonias (Cejudo, Tejada, Camargo, Higuera, & Reyes, 2005). Sin embargo en la investigación realizada se determinó que para poder observar las colonias se debe esperar de 48 a 72 horas, lo cual es un tiempo óptimo para poder presenciar colonias de color blanco y azul como muestra la (figura 3). Su tiempo de desarrollo depende de las condiciones ambientales, genéticas, nutricionales y tratamiento al que han sido sometidas, lo cual puede variar de 30 minutos a 6 meses para ver su crecimiento (Salvucci, 2010).



**Figura 3.** Placas con cultivo bacterianos de *Escherichia coli*.

## **6.2.Determinar la eficiencia.**

Para determinar este resultado con cada uno de los tratamientos se realizó diferentes cálculos entre ellos de: colonias por placa, unidades formadoras de colonias (UFC), y la eficiencia de transformación.

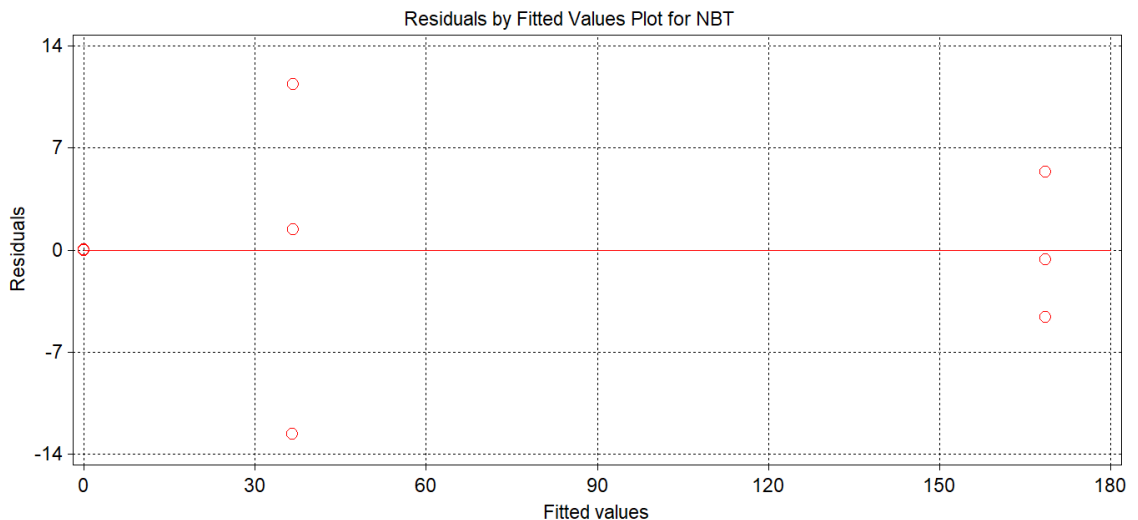
Colonias por placa, no es parte de las variables dependientes, pero en este caso se presenta como resultado, ya que es una forma de constatar y presentar los resultados obtenidos.

### 6.2.1. Colonias por placa

**Tabla 4.** Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de colonias por placa.

| Homogeneidad de Varianza | F    | P      |
|--------------------------|------|--------|
| Prueba de Levene         | 3,32 | 0,1068 |
| Prueba de O'Brien        | 1,48 | 0,3009 |
| Brown y Forsythe         | 2,37 | 0,1744 |

Las pruebas analíticas para homogeneidad de varianzas y normalidad (Tabla 4) no detectaron evidencias significativas de desvíos de ese supuesto para la variable colonias por placa. No obstante, al realizar los gráficos de valores predichos vs. residuales (Figura 4), se evidenció un patrón que sugiere un desvío importante de la homogeneidad de varianzas de los errores. Este contraste de resultados puede ser debido a que las pruebas analíticas se vieron afectadas por el tamaño de las muestras utilizadas. Por tanto, se decidió efectuar el análisis por la vía no paramétrica, aplicando la prueba de Kruskal y Wallis y las comparaciones múltiples no paramétricas. Cabe destacar que no hubo una homogeneidad de varianzas a causa de la necesaria inclusión del testigo en el experimento, el mismo que arrojó un resultado nulo.



**Figura 4.** Residuos de Homogeneidad colonias por placa

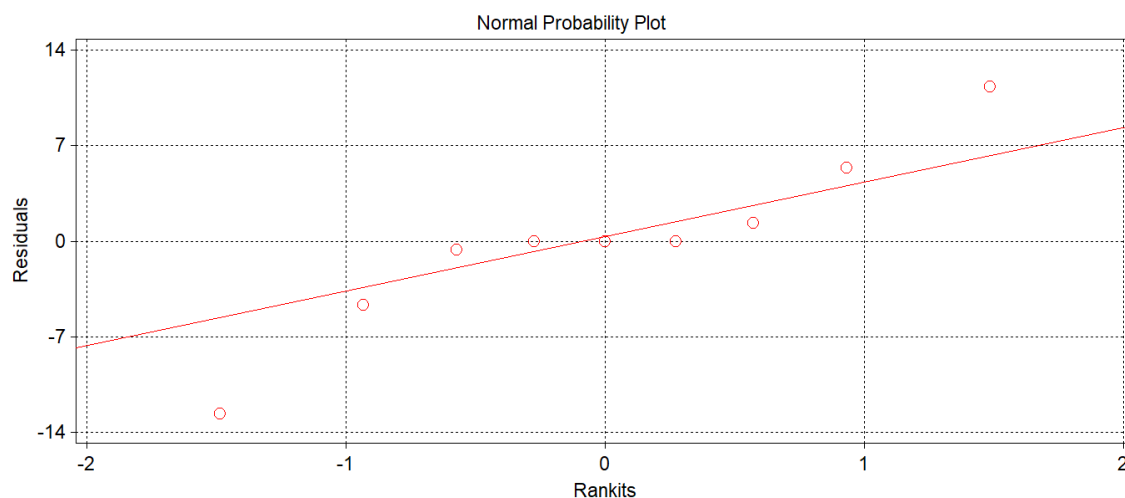
Para verificar la normalidad de los datos se realizó un análisis estadístico con la prueba de Shapiro–Wilk, lo que tiene como objetivo verificar que la distribución normal de

los datos. Sabiendo que esta prueba es la más opcionada ya que permite analizar un máximo de 50 muestras (Montalvan, 2014).

En la prueba de normalidad realizada se obtuvo los siguientes datos:

- Shapiro-Wilk:  $W=0.9248$
- $P(W)$ : 0.4336 9 casos

En la (Figura 5) muestra la distribución normal de los datos.



**Figura 5.** Normalidad de cálculo de colonias por placa de Shapiro-Wilk.

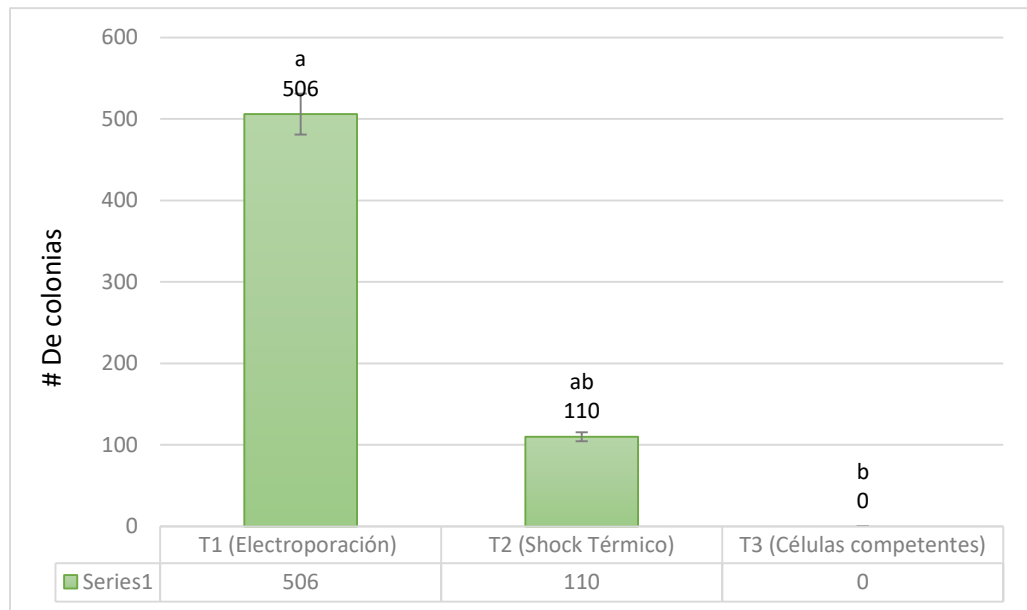
En la prueba comparativa entre los tratamientos de Kruskal-Wallis, la cual nos indica que existen diferencias altamente significativas entre el T1 (Electroporación) y T3 (Células Competentes). Es por ello que en el conteo de colonias el mejor tratamiento es el de electroporación como indica la (Figura 6).

En el conteo de las colonias presentes de cada una de las unidades experimentales se contabilizó, en el T1 corresponde (Electroporación) con 506 colonias en el total de las repeticiones, T2 (Shock Térmico) con 110 colonias y T3 (Células competentes) 0 colonias.

Para diferenciar los tratamientos y rangos de colonias por placa se los presenta en la (Tabla 5).

**Tabla 5.** Rangos Prueba de Kruskal-Wallis Colonias por placas

|    |    |
|----|----|
| T1 | a  |
| T2 | ab |
| T3 | b  |



**Figura 6.** Prueba de Kruskal-Wallis- Sumatoria de colonias por placa por cada uno de los tratamientos y repeticiones.

El T1 (Electroporación) presenta mayor número de colonias en su totalidad y en cada una de las repeticiones, T2 (Shock Térmico) presenta menor número de colonias en su totalidad y en cada una de las repeticiones, y el T3 (Células competentes) no presenta colonias, lo que indica que el plásmido no ingresó a la célula competente y por ende esta no se ha transformado (Khanacademy, 2017).

El T1 (Electroporación) se obtuvo mayor presencia de colonias con una diferencia con el T2 (Shock Térmico) de 396 colonias. Lo que da como resultado que el T1 presenta mejor resultado con la presencia de colonias por placa. Cabe recalcar que este método de transformación tiene gran eficiencia cuando se realiza a cepas de bacterias ya sean Gram Positivas o Gram Negativas, lo que no ocurre con otro tipo de microorganismos como hongos o levaduras (Ortiz, 2010).

En el Análisis de desviación estándar se determinó hasta qué punto se pueden alejar los datos del promedio establecido. Para ello realizó el análisis para cada uno de los tratamientos los cuales se los indica en las (Figura 6) donde indica el porcentaje de error.

### 6.2.2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

Para cuantificar esta variable se hizo uso de esta fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\# \text{ Colonias} \times \text{FDD}}{\text{Volumen inicial sembrado}}$$

- FDD: Factor Decimal de Dilución.  
(Camacho, y otros, 2009)

La cual permite saber el número de bacterias viables o transformadas por cada una de las placas contabilizadas (Sánchez, Núñez, Cruz, Torres, & Herrera, 2017).

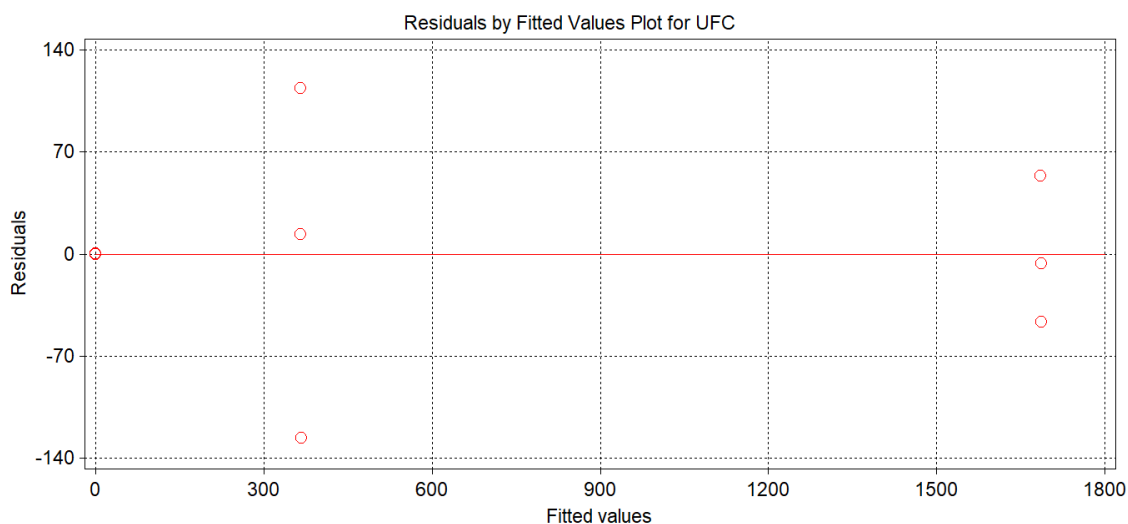
**Tabla 6.** Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de UFC.

| Homogeneidad de Varianza | F    | P      |
|--------------------------|------|--------|
| Prueba de Levene         | 3,32 | 0,1068 |
| Prueba de O'Brien        | 1,48 | 0,3009 |
| Brown y Forsythe         | 2,37 | 0,1744 |

En la prueba analítica de homogeneidad de varianza se determinó la igualdad de las varianzas para las muestras calculadas (Correa, Iral, & Rojas, 2006), en donde nos indica que no existe diferencias significativas del supuesto como indica la (Tabla 6).

También se logró evidenciar un patrón que sugiere un desvío importante de la homogeneidad de varianzas de los errores como se los presenta en la Figura 7. Este contraste también fue afectado por la cantidad pequeña de muestras analizadas, por

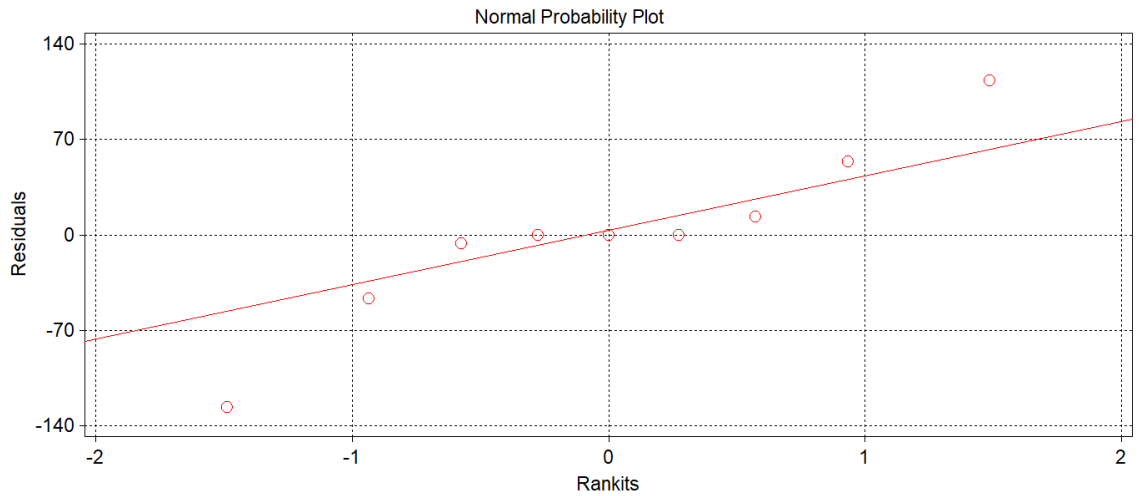
ello se realizó un análisis no paramétrico, en donde se usó la prueba de Kruskal y Wallis la cual permite realizar comparaciones entre los tratamientos.



**Figura 7.** Residuos de Homogeneidad de UFC

Esta precaución se tomó por el hecho de que el análisis de la varianza no establece una relación con la homogeneidad de varianzas. La cual es consecuencia de la inclusión del testigo en el experimento.

En la prueba de normalidad se determinó que existe una adecuada distribución de las muestras (Figura 8), en donde da como resultado que se acepta la hipótesis planteada. A pesar de aquello como ya se mencionó, la homogeneidad de varianzas no es clara por lo cual se optó por una estadística no paramétrica.



**Figura 8.** Normalidad de cálculo de UFC de Shapiro-Wilk

Para determinar la normalidad se usó la prueba de Shapiro-Wilk, en donde dio como resultado:

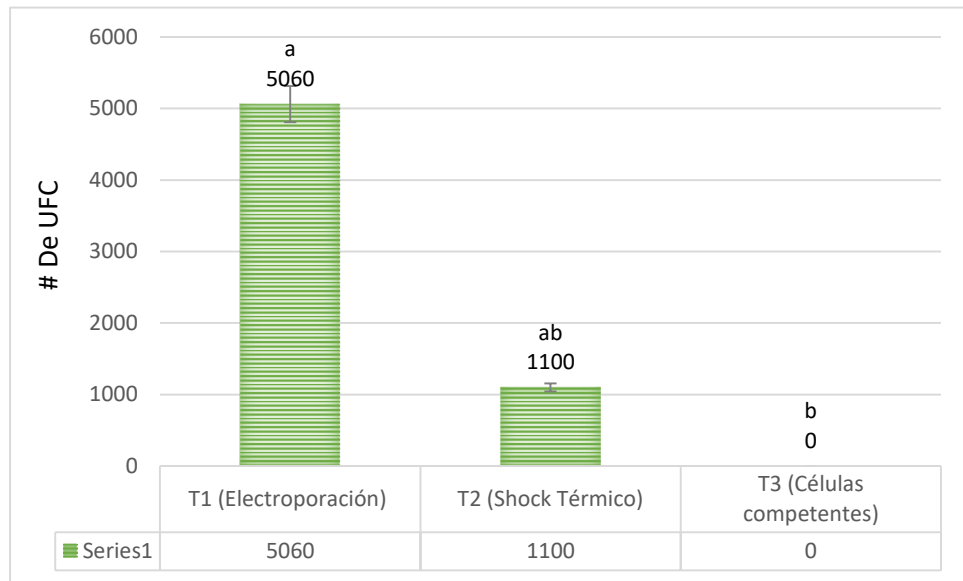
- Shapiro-Wilk: W0.9248
- P(W): 0.4336 9 muestras

En la prueba comparativa entre los tratamientos de (Kruskal-Wallis) en la variable de UFC indica que se obtuvo como resultado que T1 (Electroporación) tuvo  $5.06 \times 10^3$  UFC/ml, T2 (Shock Térmico) tuvo  $1.10 \times 10^3$  UFC/ml, T3 (células competentes) no presenta unidades formadoras de colonias, ya que no existió presencia de transformantes así como se indica en la (Figura 9).

Para detallar las UFC se presenta la Tabla 7, en donde se detalla los tratamientos con rangos.

**Tabla 7.** Rangos Prueba de Kruskal-Wallis UFC

|    |    |
|----|----|
| T1 | a  |
| T2 | ab |
| T3 | b  |



**Figura 9.** Prueba de Kruskal-Wallis- Sumatoria de UFC por tratamiento y repeticiones.

El T1 (Electroporación) presenta mayor número de UFC en su totalidad y en cada una de las repeticiones, T2 (Shock Térmico) presenta menor número de colonias en su totalidad y en cada una de las repeticiones.

Según Rivero, García & Calzada (2013) nos menciona que la frecuencia de transformación se expresa con 68.3 UFC/ml en T1 (Electroporación) y 20.1 UFC/ml en T2 (Shock Térmico), lo que nos indica que en la presente investigación se encontró mayor número de UFC, siendo este un indicador que las modificaciones realizadas han dado buenos resultados.

### **6.2.3. Eficiencia de Transformación Genética:**

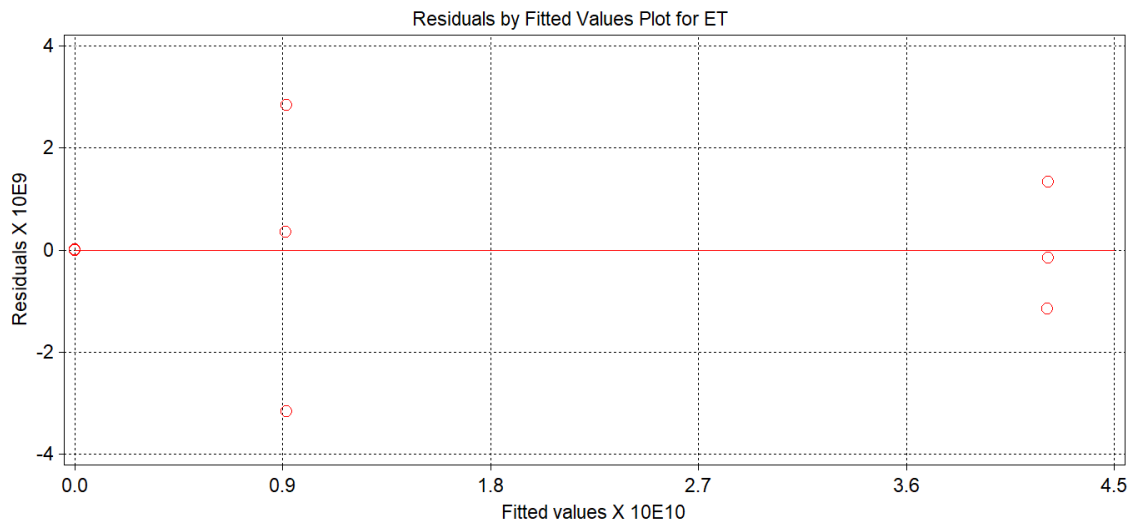
La eficiencia de transformación se califica como la cantidad de bacterias viables o transformadas correctamente. La eficiencia depende de varios factores como el tiempo de desarrollo de colonias, temperatura, pH (Ramírez & Veitía, 2013).

Para ello se realizó diferentes análisis como son las pruebas de homogeneidad de varianza y normalidad.

**Tabla 8.** Prueba analítica de Homogeneidad de Varianza de Eficiencia de transformación.

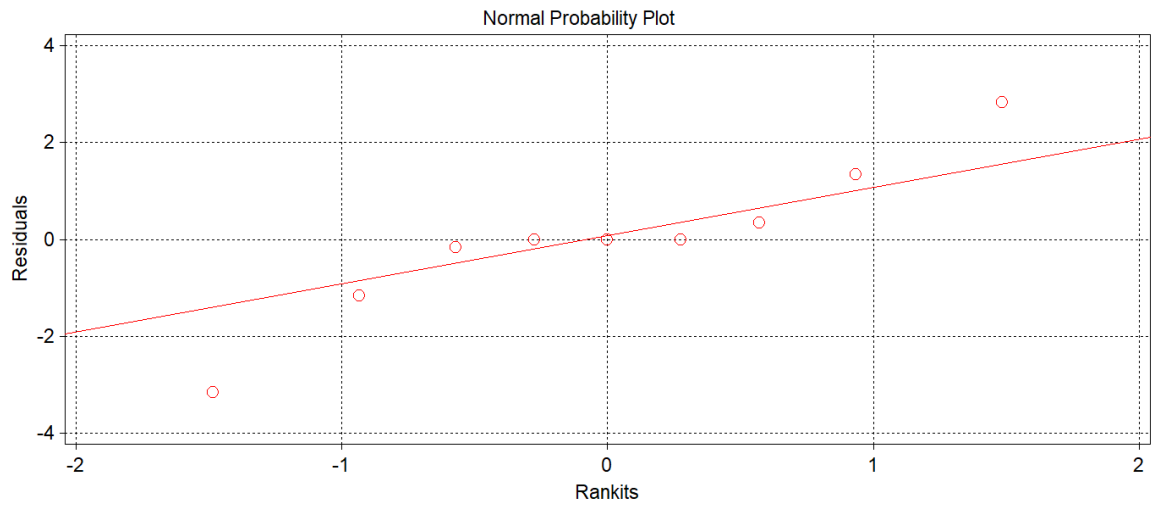
| <b>Homogeneidad de Varianza</b> | <b>F</b> | <b>P</b> |
|---------------------------------|----------|----------|
| Prueba de Levene                | 3,32     | 0,1068   |
| Prueba de O'Brien               | 1,48     | 0,3009   |
| Brown y Forsythe                | 2,37     | 0,1744   |

Las pruebas analíticas para homogeneidad de varianzas (Tabla 8) no detectaron evidencias significativas de desvíos de ese supuesto. No obstante, al realizar los gráficos de valores predichos vs. Residuales, donde se identificó un desvío importante de la homogeneidad de varianzas de los errores. Por ello se aplicó la prueba de Kruskal y Wallis y las comparaciones múltiples no paramétricas.



**Figura 10.** Residuos de Homogeneidad de Eficiencia de transformación

En la prueba paramétrica de Normalidad se identificó que la distribución de datos es normal, y para determinar se hizo uso de la prueba de Shapiro-Wilk con un p value de 0.9248. Sin embargo se utilizó una prueba no paramétrica por no tener una homogeneidad de varianzas en los datos.



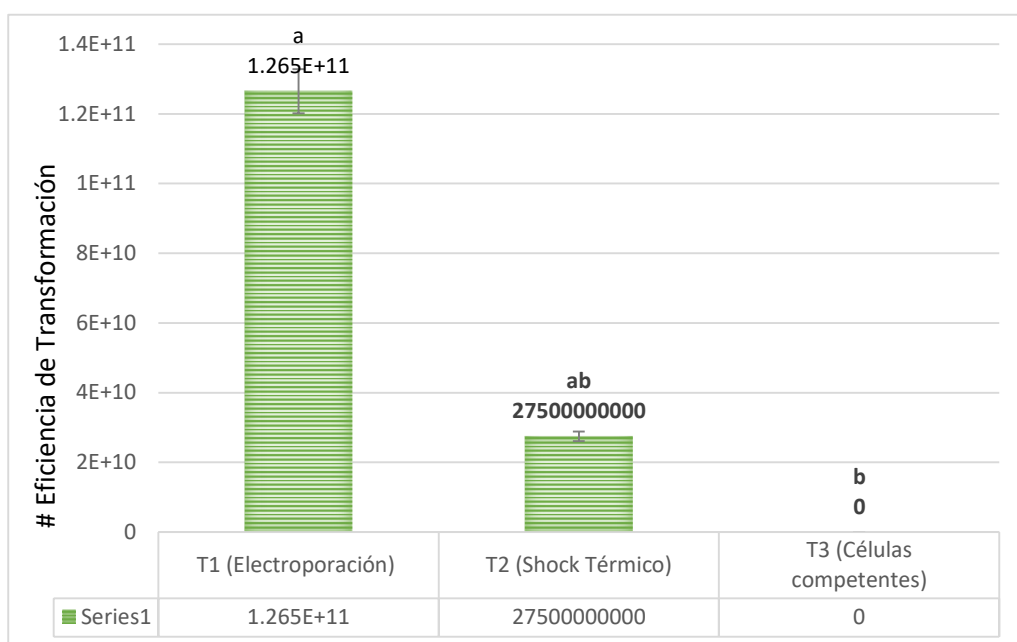
**Figura 11.** Normalidad de cálculo de Eficiencia de Transformación de Shapiro-Wilk.

En la prueba comparativa entre los tratamientos de (Kruskal-Wallis) en la eficiencia de Transformación nos indica que se obtuvo como resultado que T1 (Electroporación) tuvo  $1.265 \times 10^{11}U$ , T2 (Shock Térmico) tubo  $2.75 \times 10^{10}U$ , T3 (células competentes) no presenta colonias y por ende no se puede realizar los respectivos cálculos de eficiencia (Figura 12).

Para detallar la eficiencia de transformación se presenta la Tabla 9, en donde se detalla los tratamientos con rangos.

**Tabla 9.** Rangos Prueba de Kruskal-Wallis Eficiencia de tranformacion

|    |    |
|----|----|
| T1 | a  |
| T2 | ab |
| T3 | b  |



**Figura 12.** Prueba de Kruskal-Wallis. Eficiencia de Transformación por tratamiento y repeticiones

Según Invitrogen (2013) manifiesta que en el T1 (Electroporación) la eficiencia de transformación debe ser de  $1 \times 10^{10}U$ , en el T2 (Shock Térmico) debe tener una transformación de  $10^5U$  a  $10^7U$  (Rivero, García, & Calzada, 2013).

Es decir que la transformación realizada fue eficiente ya que sus resultados en el T1 y T2 sobrepasan los indicadores de los presentes autores, señalando que los cambios realizados en los diferentes protocolos sustentan que mejoraron su eficiencia y unidades formadoras de colonias (UFC).

Sin embargo Díaz & Chaparro (2012) indican que el método de transformación por electroporación es diez veces más eficiente que el método químico.

Argumentando que el mejor tratamiento para realizar una transformación es el T1 (Electroporación), ya que se pudo obtener mayor número de colonias por placa, UFC por ml, y Eficiencia de transformación.

### 6.3. Resultados de la Socialización

La socialización de esta investigación se realizó en el Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Al curso de Biotecnología de octavo nivel y personas interesadas en donde se dio a conocer la importancia de transformación genética y en industrias se puede practicar (Figura 13).

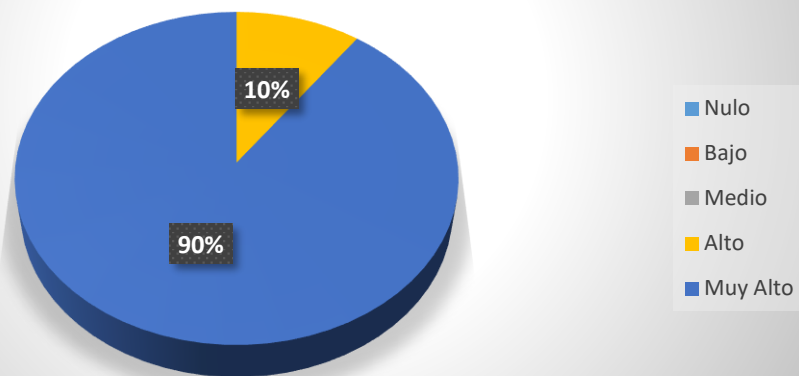


**Figura 13.** Socialización en instalaciones de la PUCE-SI

A los participantes de la socialización se realizó una encuesta para evaluar el nivel de interés, aporte a sus conocimientos y si es necesario la implementación de mejoras para futuras socializaciones. La encuesta consta de nueve preguntas las cuales son evaluadas al 100%.

En la **pregunta No 1** las personas encuestadas nos indica que el 90% muy alto creen que el lugar donde se realizó la socialización proporciono las condiciones apropiadas para su correcto desarrollo y el 10% alto creen que se puede realizar un pequeña mejor (Figura 14).

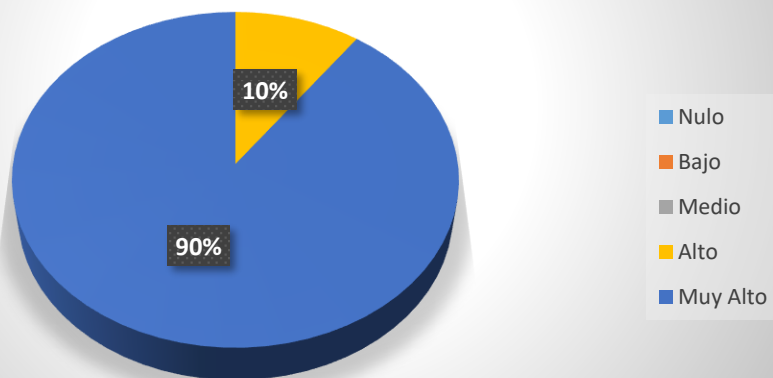
**1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?**



*Figura 14.* Representación sobre sala de desarrollo del evento.

**Pregunta No 2** Material audiovisual utilizado en la presentación fue, las personas encuestadas nos indica que el 90% muy alto, se encuentran de acuerdo con el material usado, y el 10% alto indica que el material existe un pequeño problema, por lo cual toca realizar los cambios respectivos para que sea la socialización sea entendible para los participantes

**2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?**



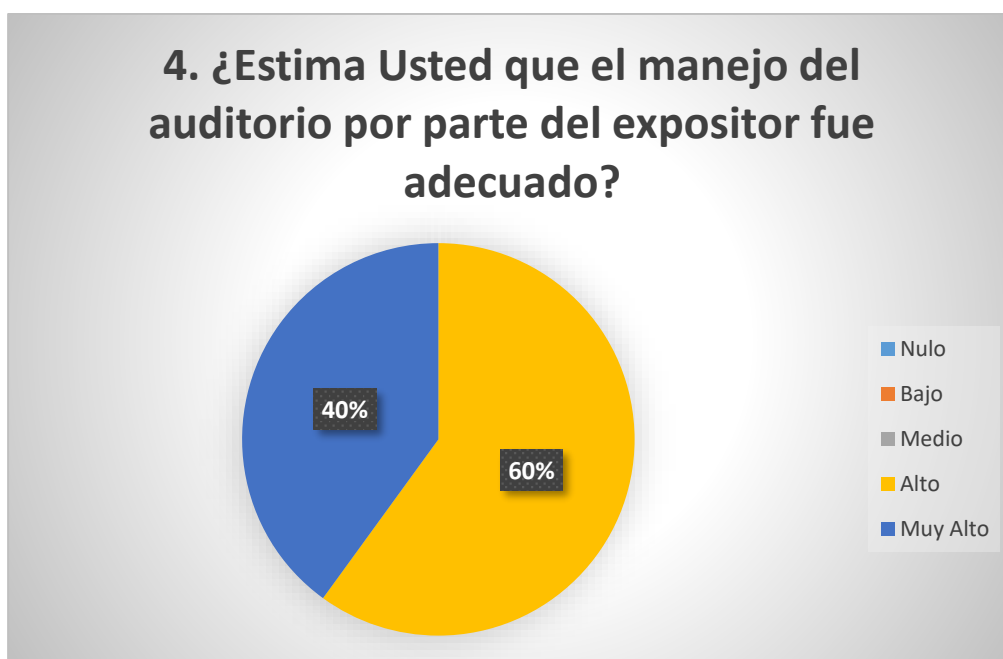
*Figura 15.* Representación sobre material audiovisual utilizado en el evento.

**Pregunta No 3** Considera que el expositor presentó dominio del tema, los participantes comentaron que el 60% muy alto se encuentran de acuerdo de la manera de exponer, y el 40% comentan que existieron problemas con el dominio del tema, por lo que es recomendable estudiar a fondo el tema para mejorar su dominio (Figura 16).



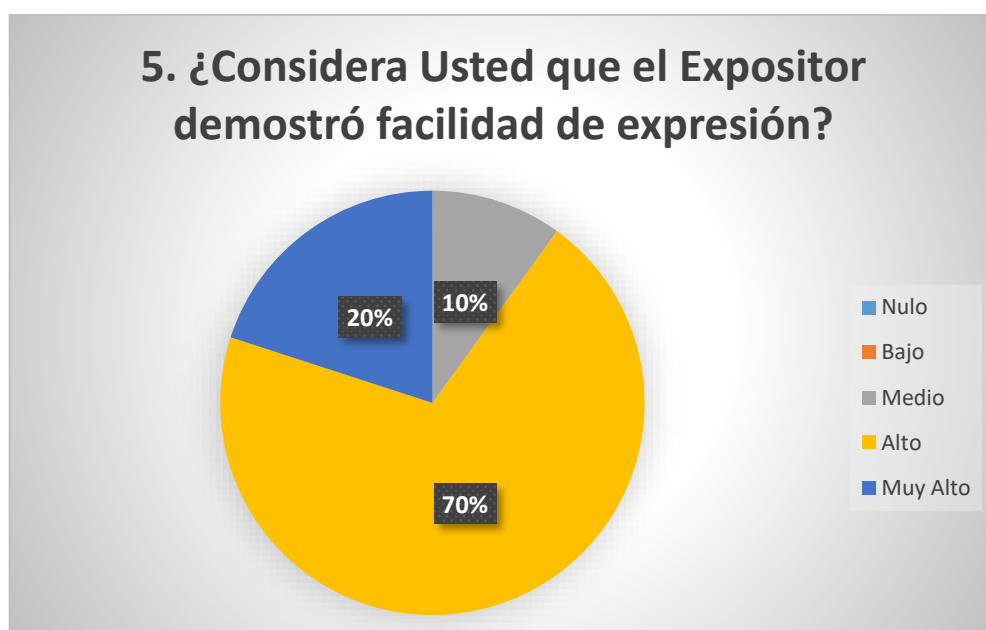
*Figura 16.* Representación sobre dominio del tema.

**Pregunta No 4** Manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado, los participantes comentaron que el 40% muy alto se encuentran de acuerdo con el manejo del auditorio por parte del expositor fue correcto, y el 60% comentan que existieron problemas por lo tanto se debe mejorar el manejo del auditorio con mucha seguridad (Figura 17).



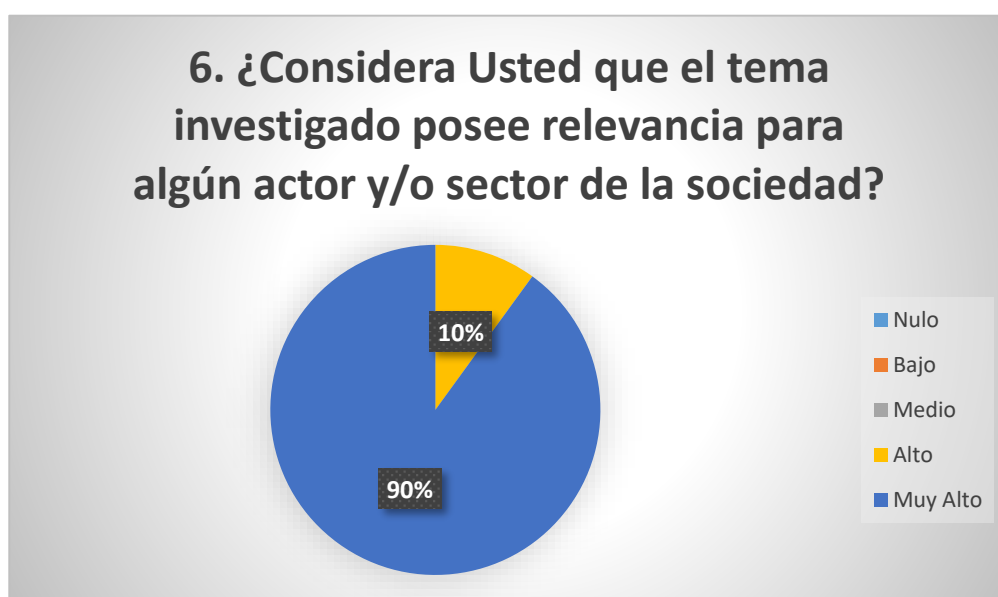
**Figura 17.** Representación sobre dominio del auditorio.

**Pregunta No 5** Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión, el 70% de los participantes comentaron que si se demostró alta facilidad para dar a conocer el trabajo de investigación, el 20% indicaron que se presentó alto nivel en la facilidad de expresión y el 10% mostraron que el nivel para expresión es medio, por lo cual se debe mostrar más seguridad en el momento de dar a conocer los resultados. (Figura 18).



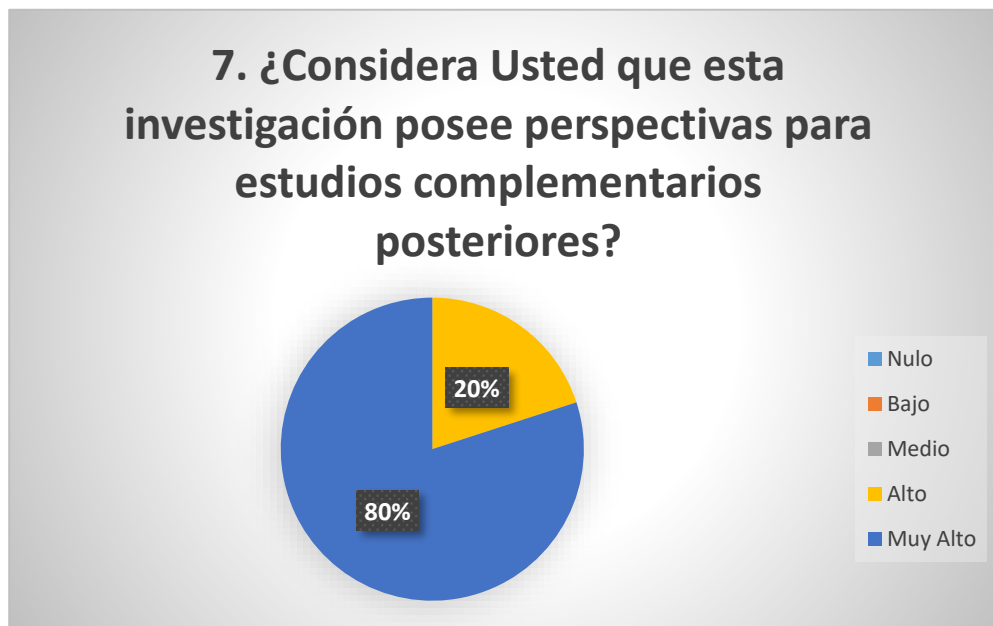
**Figura 18.** Representación sobre facilidad de expresión del compositor.

**Pregunta No 6** Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad, el 90% de las personas consideran que el tema investigado es de gran importancia para diferentes estudios que benefician a la sociedad calificándolo como muy alto, y el 10% de las personas creen que si tiene importancia en el estudio (Figura 19). Sabiendo que el tema investigado es inicio para realizar varios estudios que ayudan a mejorar la calidad de vida de las personas (Espinosa, 2012).



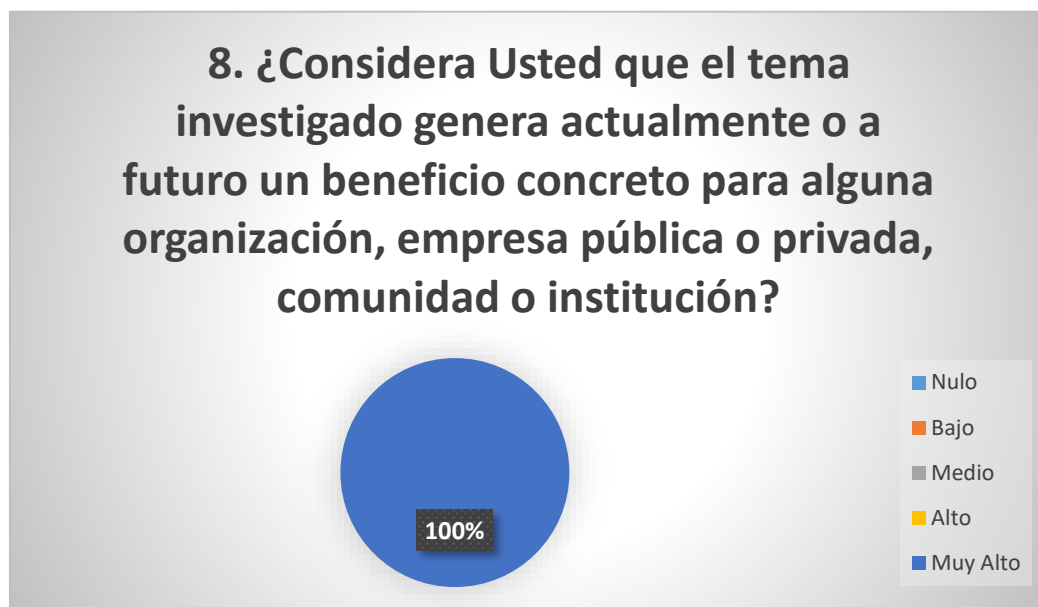
**Figura 19.** Representación sobre relevancia de la investigación a la sociedad.

**Pregunta No 7** Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores, el 80% de las personas califican como muy alto, los cuales creen que el tema investigado es el paso para realizar diferentes investigaciones, y el 10% de las personas piensan que si tiene importancia en el estudio (Figura 20).



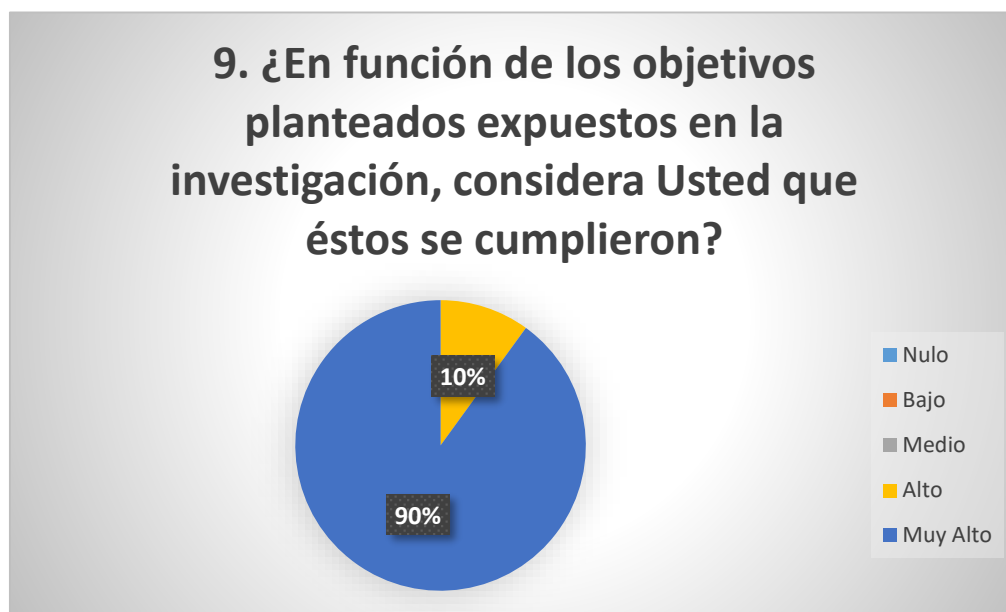
**Figura 20.** Representación sobre perspectivas para estudios complementarios de la investigación.

**Pregunta No 8** Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución, el 100% de las personas se encuentran de acuerdo que la investigación provee de beneficios futuros para diferentes entidades (Figura 21).



**Figura 21.** Representación de beneficios actuales y futuros de la investigación

**Pregunta No 9** En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron, las personas encuestadas dieron a conocer que el 90% de los objetivos se han cumplido totalmente, y el 10% creen que los objetivos se han cumplido parcialmente (Figura 22).



*Figura 22.* Representación cumplimiento de objetivos

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1. CONCLUSIONES

- Los problemas que existen en los diferentes métodos de transformación bacteriana, han ocasionado que estos efectos se reduzcan, es por ello que se ha logrado estandarizar los protocolos tanto de Shock Térmico como de Electroporación, perfeccionando así la eficiencia de transformación, unidades formadoras de colonias y colonias por placa, de esta forma mejorando significativamente los resultados obtenidos.
- En el ensayo microbiológico de cada una de las placa nos mostró que las UFC se desarrollaron de mejor manera en el T1 (Electroporación) con un resultado de  $5.06 \times 10^3$  UFC/ml, en este tratamiento se ha logrado que las bacterias transformadas desarrollen significativamente en comparación con el T2 (Shock Térmico).
- En los análisis de eficiencia de transformación reveló que el mejor tratamiento es T1 (Electroporación), ya que se encuentra por encima de los límites establecidos, obteniendo una eficiencia de  $1.265 \times 10^{11}$  U células transformadas.
- El tratamiento de Shock térmico es un método sencillo el cual puede ser realizado por estudiantes, los cuales cuenten con conocimiento básico, ya que no se necesita de mucha precisión para realizar la transformación, en comparación al tratamiento de electroporación es un método más complejo el cual necesita un conocimiento extra, ya que las células sometidas a los impulsos necesitan ser estudiadas a fondo, sin contar que el dispositivo con el que se va a trabajar (electroporador) necesitar ser manejado con mucho cuidado y precisión.
- De esta manera quedó comprobado la hipótesis planteada, en donde el T1 (Electroporación), es el método más eficiente de transformación, dando mejores resultados en comparación del T2 (Shock Térmico) y T3 (Células competentes) con respecto al número de células transformadas.

- De acuerdo con las diferentes pruebas analíticas se determinó que por el tamaño de las muestras analizadas, no es necesario realizar un análisis paramétrico, es por ello que se optó por realizar un análisis no paramétrico haciendo uso de la prueba de Kruskal y Wallis, esta medida se tomó por el hecho por que el análisis de la varianza no es robusto a la no homogeneidad de varianzas.
- Este trabajo investigativo fue socializado en las instalaciones de Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, en donde realizó a personas involucradas en esta temática, como son los alumnos de la carrera de Agropecuaria en la materia de Biotecnología, siendo dos días, un día teórico y otro día práctico, donde se les enseñó a los participantes paso a paso el proceso de transformación genética.

## **7.2.RECOMENDACIONES**

- En el caso de no hacer desarrollar las células bacterianas competentes en caldo LB, es de gran importancia tener cuidado con el cambio brusco de temperatura, por ello es importante subir gradualmente con hielo ya que las células se encuentran a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  y cambiarlas bruscamente a temperatura ambiente pueden ocasionar la muerte o en el mejor de los casos una transformación pero con baja eficiencia (Trujillo, 2004).
- Es importante para que células competentes se adapten a condiciones extremas, se las haga crecer en caldos de cultivo de LB, lo cual después de 24 horas el caldo se presenta con una característica turbia, y de ello se extraer pellet, lo cual son células que han adaptado a sobrevivir en medio LB, a temperatura extremas, y a ciertos movimientos bruscos.
- Al término del proceso de transformación de la Electroporación y Shock Térmico es recomendable que las células expuestas a los impulsos eléctricos y a los cambios de temperatura se coloque medio LB o S.O.C ya que estos con restablecedores los cuales ayudan y promueve al desarrollo de las células transformadas.

- Es importante que al momento de realizar la electroporación, las células competentes conjuntamente con el plásmido sean sometidos por una ocasión a impulsos eléctricos, ya que si no se lo hace de esta manera la mezcla de estos componentes se encuentran en peligro de no transformarse y de algún tipo de contaminación. Por otro lado, al estresar a las células provocamos que estas mueran y el plásmido se degrade con facilidad, disminuyendo la eficiencia de transformación.
- La cubeta que sirve de soporte para la Neon Pipette, es importante que se encuentre a la misma temperatura del Buffer Electrolytic (2 °C), ya que de esta manera no ocasionamos estrés a las células con plásmido por el cambio de temperatura.
- Es de gran importancia que el lugar en donde se va a trabajar, equipos e instrumentos se encuentre totalmente aséptico, ya que de esta forma evitamos posibles contaminaciones que afectan directamente a la investigación.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, M., Acosta, R., & Paredes, L. (2007). Que es la Ingenieria Genética . *ArgenBio*, 31-68.
- Aldrich, S. (2014). *5-BROMO-4-CHLORO-3-INDOLYL b-DGALACTOPYRANOSIDE*. Obtenido de [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/b9146pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b9146pis.pdf)
- Almeida, L. O. (2010). *Ingeniería Genética*. Obtenido de Ingeniería Genética: <http://blog.educastur.es/entrelneas/files/2010/05/ingenieria-genetica-lucia-obeso-almeida.pdf>
- Alvarés, M. P. (2005). *Microbiología Clínica*. Obtenido de Microbiología Clínica: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema04.pdf>
- Articoli, T. -N. (19 de Septiembre de 2015). Trasformazione batterica.
- Ayala, H. (s.f.). *Unidad de Diluciones*. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico en Humacao Departamento de Biología Programa de Microbiología Aplicada.
- Betancor Gadea, K. F. (2008). *Genética Bacteriana*. Obtenido de Genética Bacteriana:
- Betancor, M., Gadea, K., & Flores. (2015). *Genética bacteriana*. Obtenido de <http://130.206.160.21/rid=1NQMWD86S-1N93KN5-R6/GeneticaBacteriana.pdf>
- BioLabs, N. E. (Julio de 2014). *pUC19 Vector*. Obtenido de [https://www.neb.com/-/media/nebus/page-images/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps/puc19\\_map.pdf?la=en](https://www.neb.com/-/media/nebus/page-images/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps/puc19_map.pdf?la=en)
- Brown. (2006). *Gene Cloning y AND Analysis*. Estados Unidos : Blackwell Publishing Ltd, 9600 Road, Oxford OX4 2DQ, UK.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, M., & Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. México: 2ª ed. Facultad de Química, UNAM.
- Cejudo, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., & Reyes, E. (2005). Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante . Córdoba: Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071.
- Correa, J., Iral, R., & Rojas, L. (2006). Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. *Revista Colombiana de Estadística*, 57 - 76.
- Díaz, C., & Chaparro, A. (2012). Métodos de transformación genética de Plantas. *SciELO*, 1-13.
- Espinosa, R. (2012). *Fundamentos Teóricos de la Transformación en Celulas* . Obtenido de <http://jci.uniautonoma.edu.co/2012/2012-3.pdf>

- Facultad de Ciencias Exactas, U. N. (2008). *Transformación de plásmidos*. Obtenido de <https://www.biol.unlp.edu.ar/bioquimica3/TP3-09.pdf>
- Galván, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., & Reyes, E. (20014). *Transformación de Escherichia coli con un plásmido recombinante*. Cordova.
- Godiska, R., Patterson, M., Schoenfeld, T., & Mead, D. (2005). *Beyond pUC: Vectors for Cloning ctors for Cloning*. Middleton: Edited by Jan Kieleczawa.
- Granados, C., & Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Scielo*, 0123-4226.
- Hu, X., Do, D., & Yu, Q. (1992). Effects of supporting and buffer electrolytes (NaCl, CH<sub>3</sub>COOH and NH<sub>4</sub>OH) on the diffusion of BSA in porous media. *ScienceDirect*, 151-164.
- Invitrogen. (2012). Medium S.O.C. *Thermo Fishe*.
- Invitrogen. (2013). One Shot® TOP10 Competent Cells. En Invitrogen. Life Technologies Corporation. All rights reserved.
- Invitrogen. (2014). En Invitrogen, *Neon Transfection System* (págs. 4-15). Thermo Fisher Scientific Inc.
- Invitrogen. (2014). *Neon Transfection System*. Estados Unidos: Thermo Fisher Scientific.
- Jones, E., Miller, M., & Brown, J. (2017). Vectores de Clonación. *IBIAN Techonogies* , 2-10.
- Khanacademy. (2017). Transformación y selección bacteriana. 3.
- León, T., & Matalonga, J. (2012). Ingeniería genética. *Xplorehealth*.
- López, L., Hernández, M., Castro, C., Ortega, S., González, G., & Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Medigraphic*, 12-13.
- Martini, M. (2016). *Transformación de plásmidos*. La Plata: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Montalvan, L. C. (14 de Octubre de 2014). *PRUEBA DE SHAPIRO-WILK PARA PROBAR NORMALIDAD*. Obtenido de <https://prezi.com/vnmuq6wdk149/prueba-de-shapiro-wilk-para-probar-normalidad/>
- Mussin, V. C. (2006). *Organismos Genéticamente Modificados (OGM): Usus Alimentarios*. Obtenido de [http://www.biblioteca.unp.edu.ar/bcentral/Doc\\_digitales/Organismos%20Geneticament e%20Modificados%20\\_OGM\\_%20Usos%20Alimentarios.PDF](http://www.biblioteca.unp.edu.ar/bcentral/Doc_digitales/Organismos%20Geneticament e%20Modificados%20_OGM_%20Usos%20Alimentarios.PDF)
- Ortiz, D. I. (Agosto de 2010). *Desarrollo de un nuevo método de transformación genética en el reino Fungi (Tesis Pregado)*. Guanajuato: CENTRO DE investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. .

- Ramil, J. S. (2011). *Ingeniería genética. Biotecnología*. Obtenido de [http://www.tirsoferrol.org/ciencias/pdf/a22\\_ingenieria%20genetica.pdf](http://www.tirsoferrol.org/ciencias/pdf/a22_ingenieria%20genetica.pdf)
- Ramírez, A., & Veitía, N. (2013). Factores que influyen en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. *Biotecnología Vegetal*, 2075-2154.
- Rivero, Y., García, A., & Calzada, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 2-4.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. 465.
- Salvucci, D. M. (Abril de 2010). *Crecimiento microbiano*. Obtenido de <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>
- Sánchez, E., Núñez, D., Cruz, R., Torres, M., & Herrera, E. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 2.5 México.*, 1-15.
- Satorre, E. (Julio de 2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. págs. 26 - 27.
- Spendeler, L. (2005). Organismos modificados genéticamente: una nueva amenaza para la seguridad alimentaria. *Revista Española de Salud Pública*, 272-273.
- Stanley, C., Annie, C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. págs. 2110 - 2111.
- Trujillo, G. (2004). Desarrollo de marcadores SACAR y CAPS en QTL con efectos importantes sobre la resistencia al tizon en el tardo de papa. Peru.
- Uptima. (2015). *X-Gal and other Galatosidase substrates*. Obtenido de <http://www.interchim.fr/ft/4/40534M.pdf>
- Yi, Y., & Kuipers, O. (2017). Development of an efficient electroporation method for rhizobacterial *Bacillus mycoides* strains. *ScienceDirect*, 82-86.
- Zhang, Z., Ding, Z., Shu, D., Luo, D., & Tan, H. (2015). Development of an Efficient Electroporation Method for Iturin A-Producing *Bacillus subtilis* ZK. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 7334-7351.
- Zhao, T., Wang, Z., Su, L., Sun, X., Cheng, J., Zhang, L., . . . Xin, H. (2017). An efficient method for transgenic callus induction from *Vitis amurensis* petiole. *PLOS*.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexos 1 Socialización



*Figura 23.* Socialización Día 1- Teórico



*Figura 24.* Socialización Día 2 – Práctico.



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES  
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

### PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

|           |                               |   |              |
|-----------|-------------------------------|---|--------------|
| FECHA     | 11 y 12 de abril del 2018     |   |              |
| EXPOSITOR | Infa. Jhesselyn Mariona Torán |   |              |
| LUGAR     | DENTRO FUCESI                 | X | FUERA FUCESI |

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

| DETALLE DE VALORACIÓN   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| <b>ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:</b>  |   |   |   |   |   |
| 1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?  |   |   |   |   |   |
| 2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?  |   |   |   |   |   |
| <b>EVOLUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR</b>   |   |   |   |   |   |
| 3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?   |   |   |   |   |   |
| 4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuada?  |   |   |   |   |   |
| 5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?   |   |   |   |   |   |
| <b>MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:</b>   |   |   |   |   |   |
| 6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?  |   |   |   |   |   |
| 7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?  |   |   |   |   |   |
| 8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución? |   |   |   |   |   |
| 9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?  |   |   |   |   |   |
| <b>REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO</b>   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
| <b>MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD</b>              |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |
| <b>INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO</b>  |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |

Figura 25. Encuesta Realizada el día de la socialización

Fuente. Ingeniero Edwin del Pozo

## 9.2. Anexos 2 Esquemas protocolos

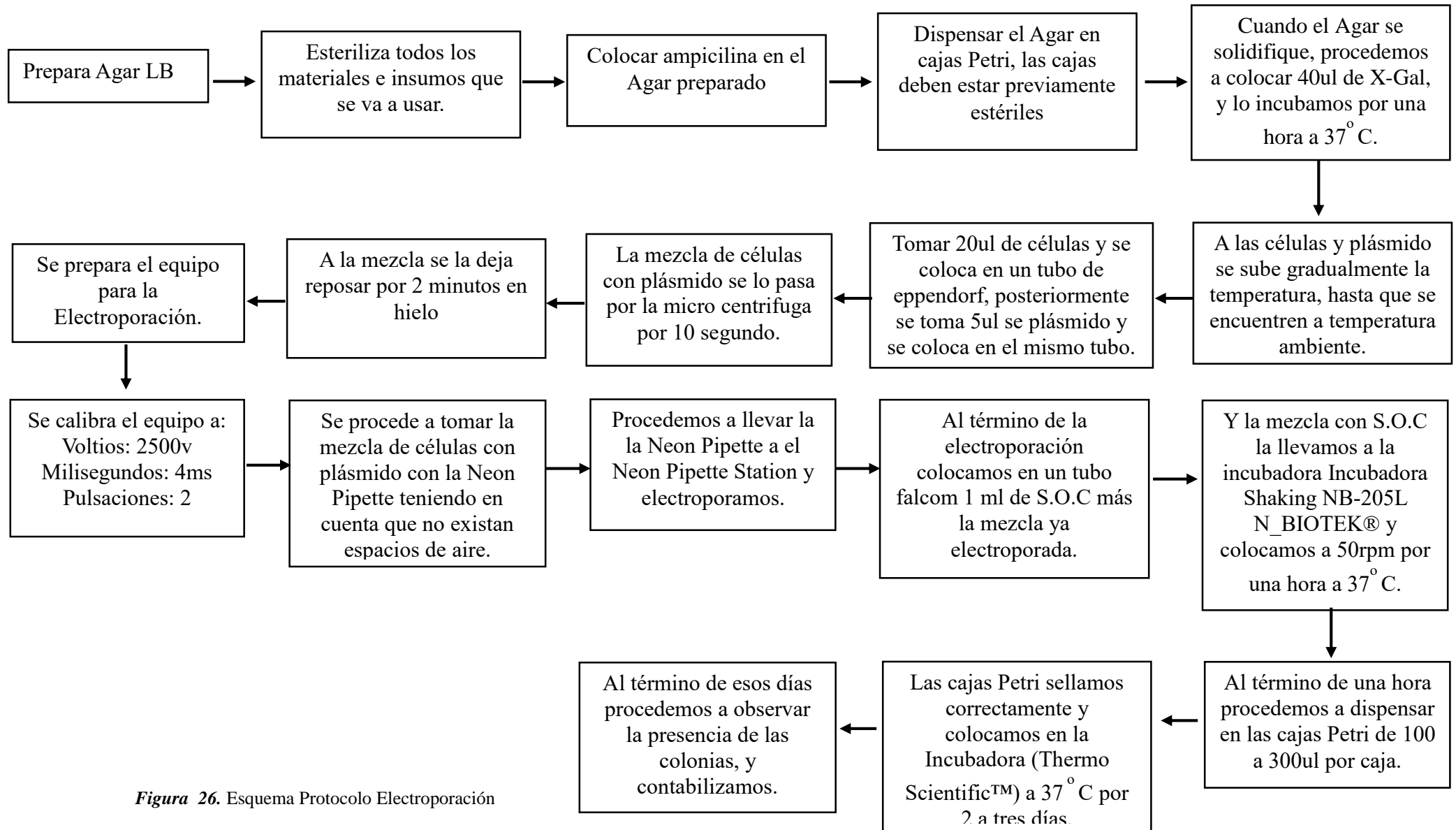


Figura 26. Esquema Protocolo Electroporación

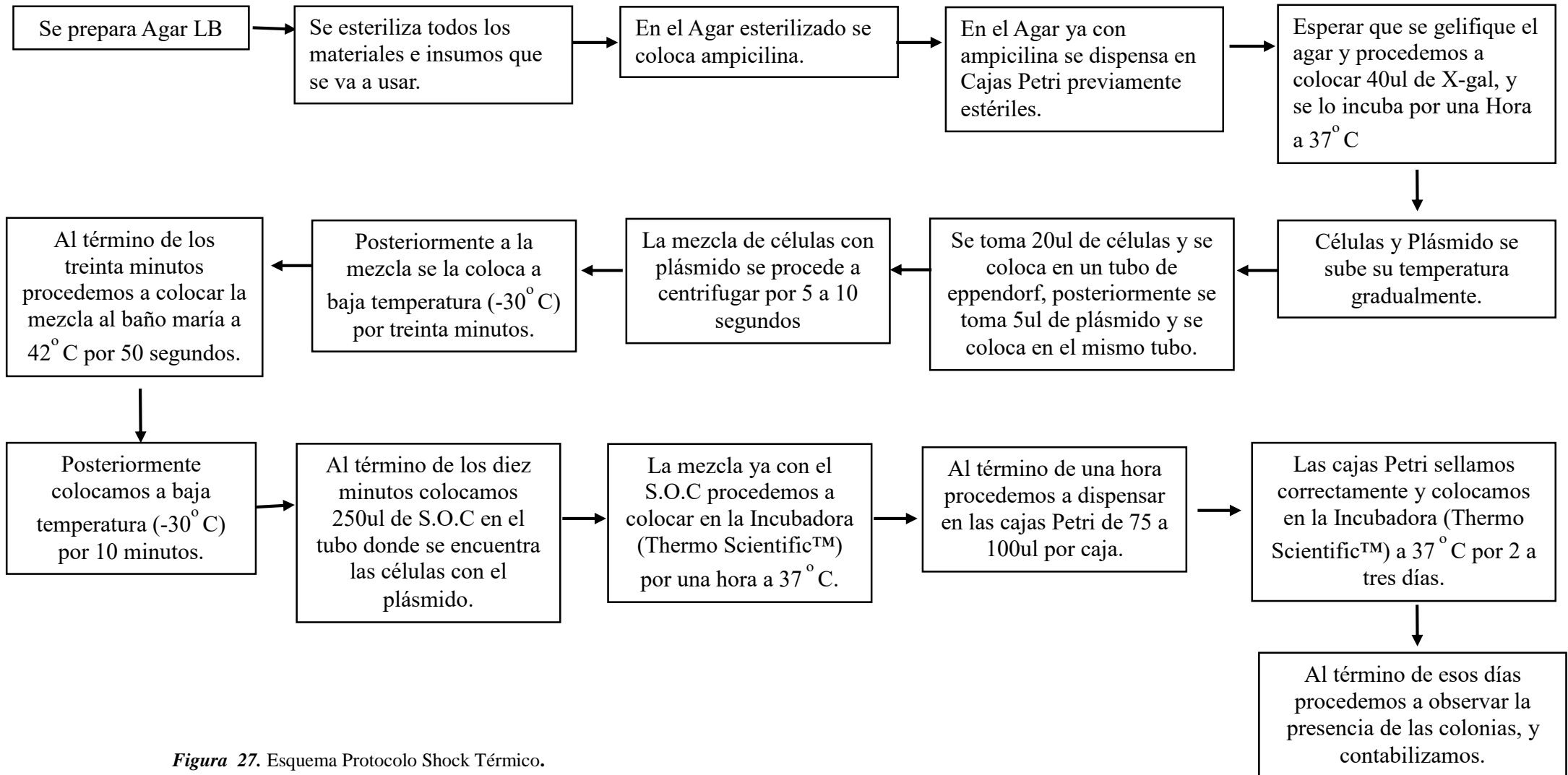


Figura 27. Esquema Protocolo Shock Térmico.

### 9.3. Anexos 3 Uso de Equipos

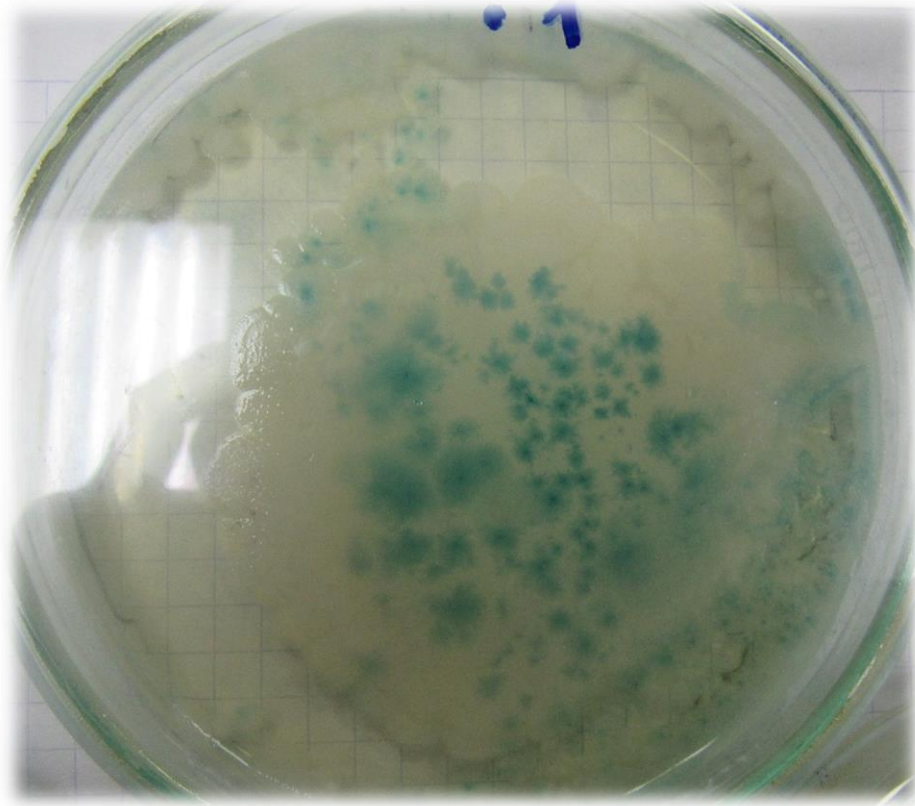


*Figura 28.* Electroporador

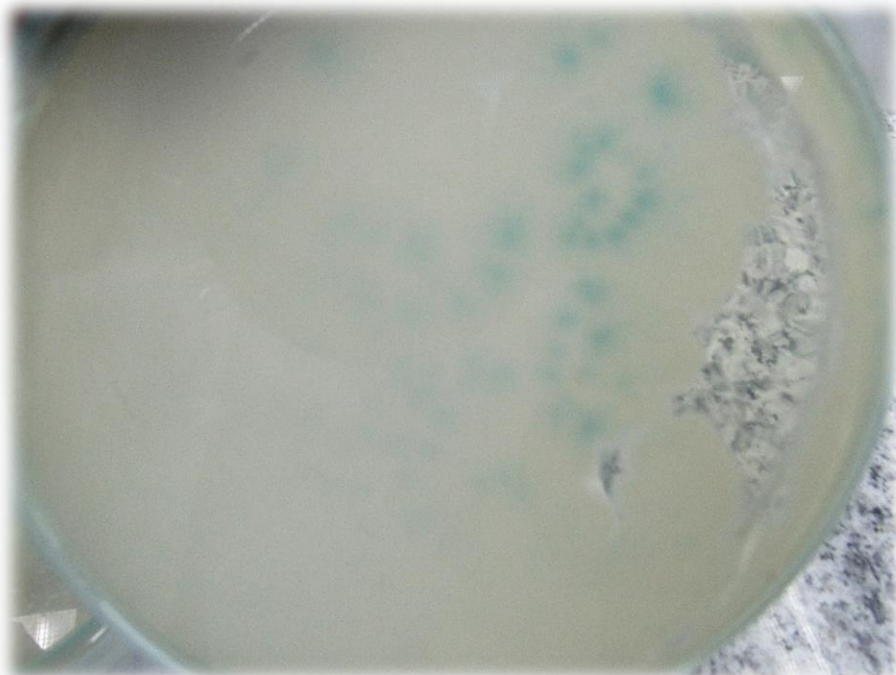


*Figura 29.* Contador de Colonias.

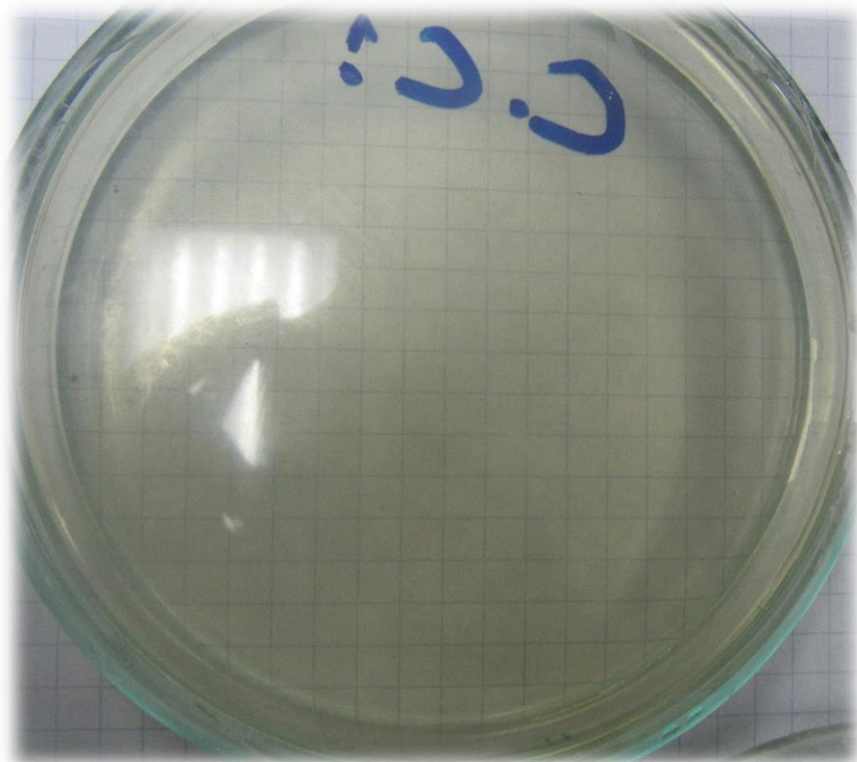
#### 9.4.Anexos 4 Desarrollo de colonias



*Figura 30.* Colonias T1 (Electroporación).



*Figura 31.* Colonias T2 (Shock Térmico)



*Figura 32.* Colonias T3 (Células Competentes).