

Bacterias hidrocarbonoclastas modificadas genéticamente para emplearlas como herramienta de visualización

Hydrocarbonoclasses bacteria modified genetically as a visualization tool

Víctor Alberto Curiel Ruiz *,
Tecnológico de Estudios Superiores de Chimalhuacán, México
cm280614@gmail.com

Julián Delgadillo Martínez,
Colegio de Postgraduados, México
juliandm@colpos.mx

David Antonio Moreno Medina,
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, México
david.moreno@uaem.mx

Recibido 15, octubre, 2017

Aceptado 24, enero, 2018

Resumen

En México, la industria del petróleo tiene un impacto negativo en materia ambiental. No obstante, existen organismos que degradan y limpian estos sitios contaminados. Las nuevas técnicas de biología molecular, aplicadas a estudios de biorremediación, ofrecen posibilidades para analizar la estructura, composición y cambio poblacional de las comunidades microbianas del suelo, durante procesos de biodegradación. Una técnica de biología molecular para la cuantificación de microorganismos es el uso de proteínas fluorescentes, valiosas herramientas para estudiar las comunidades microbianas en su entorno natural. De esta manera, el objetivo de este trabajo fue transformar una cepa bacteriana con elevada capacidad de degradar hidrocarburos con una proteína que emite fluorescencia permitiendo su visualización in vivo y que pueda mantenerse a lo largo de un ensayo de infección. Se usó la proteína fluorescente mCherry dentro de un plásmido y se insertó en la cepa CPO2.8II. El Método de transformación genética fue por choque térmico. Se obtuvo una cepa CPO2.8II que, además de ser hidrocarbonoclasta, emitía fluorescencia. Se obtuvo un protocolo de transformación para este tipo de bacterias. Se propone utilizar estas cepas transformadas como una herramienta para la localización de células bacterianas en secciones delgadas de suelo contaminadas con hidrocarburos, observando su comportamiento y su acción in vivo.

Palabras Clave: Hidrocarburos, Proteínas Fluorescentes, Transformación genética, Bacterias hidrocarbonoclastas.

Abstract

In Mexico, the oil industry has a negative impact on the environment. However, there are organisms that degrade and clean these contaminated sites. The new techniques of molecular biology, applied to bioremediation studies, offer possibilities to analyze the structure, composition and population change of the microbial communities of the soil, during biodegradation processes. A technique of molecular biology for the quantification of microorganisms is the use of fluorescent proteins, valuable tools to study the microbial communities in their natural environment. In this way, the objective of this work was to transform a bacterial strain with high capacity to degrade hydrocarbons with a protein that emits fluorescence allowing its visualization in vivo and that can also be maintained

throughout an infection test. The mCherry fluorescent protein was used within a plasmid and inserted into strain CPO2.8II. The method of genetic transformation was by thermal shock. A CPO2.8II strain was obtained which in addition to being hydrocarbonoclastic, emitted fluorescence. A transformation protocol was obtained for this type of bacteria. It is proposed to use these transformed strains as a tool for locating bacterial cells in thin sections of soil contaminated with hydrocarbons, observing their behavior and their action in vivo

Keywords: *Hydrocarbons, Fluorescent Proteins, Genetic transformation, Hydrocarbonoclastic Bacteria*

INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema heterogéneo donde el comportamiento de los microorganismos es afectado por su microambiente inmediato. Éste influencia la captura de nutrimentos, competencia, riesgo de predación, sobrevivencia dinámica de las especies, así como su diversidad genética (González, 2014). El conocimiento de las poblaciones microbianas presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante procesos de biorremediación, es aún limitado.

Aumentar el conocimiento en este campo debe ser prioritario para futuras investigaciones, ya que sería útil para disponer de más información sobre qué microorganismos son capaces de adaptarse a estos hábitats y poder explotar así sus capacidades. Además, es necesario estudiar las comunidades de microorganismos porque el metabolismo de sustratos orgánicos en sistemas naturales suele producirse mediante interacciones metabólicas entre distintos organismos (Lladó, 2012).

El análisis cuantitativo de la distribución espacial de bacterias en el suelo requiere la localización de células bacterianas para ser medidas con precisión a diferentes escalas. Durante los últimos 20 años han aumentado, de forma significativa, las metodologías para estudiar la diversidad microbiana presente en la biosfera. No obstante, todavía queda mucho camino por recorrer. De hecho, existe mucha controversia y el orden de magnitud todavía es desconocido, aunque algunos estudios apuntan que en un gramo de suelo podrían estar presentes entre 10^2 y 10^7 especies distintas de microorganismos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que solo entre un 0.001 y un 1% de los microorganismos viables son cultivables (Lladó, 2012).

Las técnicas actuales de biología molecular, aplicadas a estudios de biorremediación, nos ofrecen posibilidades para analizar la estructura, composición y cambio poblacional de las comunidades microbianas del suelo, durante procesos de biodegradación. Ramírez (2014) sostiene que las nuevas aproximaciones experimentales sugieren la identificación de cepas bacterianas como parte de enfoques biotecnológicos dirigidos a futuros programas de rehabilitación de lugares contaminados.

Por tanto, las comunidades microbianas tales como fijadores de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos y degradadoras de hidrocarburos, son una fuente importante de microorganismos con aplicaciones potenciales para diversos fines biotecnológicos tales como producción sostenible de biocombustibles y cultivos, fitorremediación y biorremediación de suelos y aguas contaminadas, o para mejorar la reforestación.

La biorremediación es una alternativa costo/eficiente para restablecer la calidad del ambiente en el recurso suelo. El éxito de esta tecnología depende de la existencia, en el lugar contaminado, de microorganismos con la capacidad metabólica apropiada para transformar los compuestos xenobióticos, en compuestos que puedan ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos. Por esta razón, es indispensable realizar la caracterización microbiológica en el sitio del derrame ésta debe constar de 2 estudios: la cuantificación de los microorganismos presentes, la cual incluye las pruebas

de biofactibilidad; y los estudios de biodegradabilidad en laboratorio; en su conjunto esta información es indispensable para predecir el tiempo que tomará la biodegradación en campo (Arrieta, y otros, 2012).

Una técnica de biología molecular, para la cuantificación de microorganismos es el uso de las proteínas autofluorescentes, que son valiosas herramientas para estudiar las comunidades microbianas en su entorno natural (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010). El uso de estas proteínas es importante como marcador de selección, pero también es de gran utilidad para visualizar y monitorear bacterias en su ambiente. Comúnmente se han usado plásmidos con la proteína fluorescente expresada de forma constitutiva.

Este estudio tuvo como objetivo insertar la proteína fluorescente de color rojo mCherry presente en el constructo pMP7604, y usarla para marcar la cepa CPO2.8II para la visualización. Posteriormente se propondrá utilizarlas para la localización de células bacterianas en secciones delgadas de suelos contaminados con petróleo, ver Figura 1. Ese vector se eligió por su capacidad selectiva, por la facilidad con la que se introduce en la cepa bacteriana y por su alto nivel de expresión debido a que el plásmido es de un alto número de copias.

Esto contribuirá a la comprensión de la interacción de bacterias hidrocarbonoclastas en un suelo contaminado con petróleo.

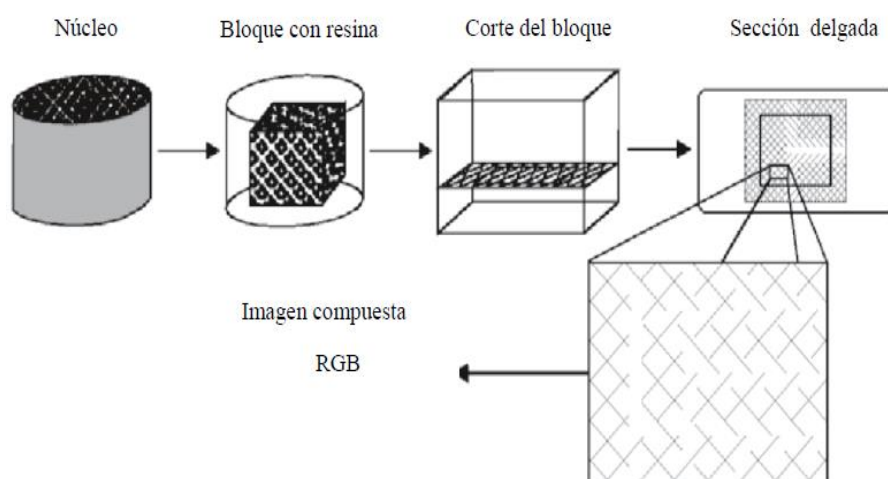


Figura 1. Producción de secciones delgadas y su visualización (González, 2014).

MÉTODOS Y MATERIALES

CEPA BACTERIANA

La cepa que se utilizó en el presente trabajo, *Enterobacter* sp CPO2.8II, pertenece a la colección del laboratorio de Fijación de Nitrógeno del Colegio de Postgraduados. Se ha demostrado mediante bioensayos que es una bacteria hidrocarbonoclasta. La bacteria se cultivó en agar y caldo nutritivo en pH de (7-7.3) y temperatura óptima de 28°C, los caldos nutritivos se incubaron a 180 rpm.

PLÁSMIDO

Debido a que el plásmido es usado comúnmente en bacterias Gram negativas y brinda excelentes resultados se eligió el plásmido mCherry pMP7604 que contiene el gen mCherry, ver Figura 2, con resistencia a la Tetraciclina, con un máximo de excitación: 587 nm y un máximo de emisión: 610 nm.

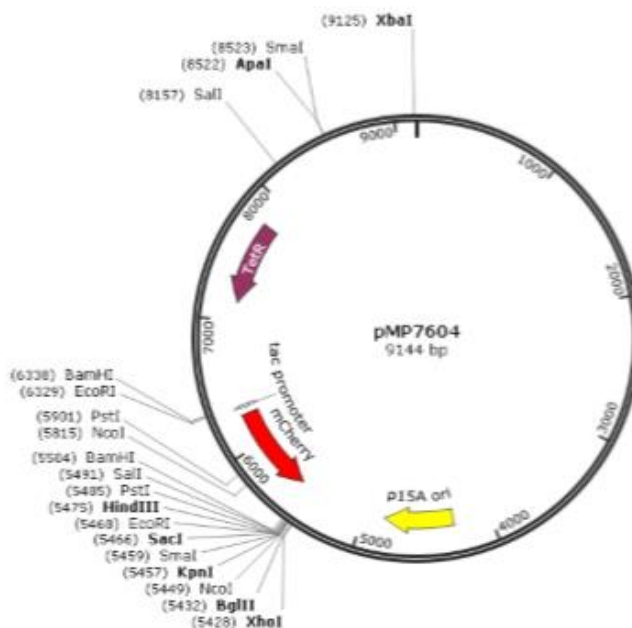


Figura 2. Mapa del plásmido de pMP7604 (Bredenkamp, 2014)

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

La preparación de células competentes se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Sambrook *et al.* (1989) con modificaciones descritas en Serrano-Rivero *et al.* (2013). Se inoculó 1 mL de un precultivo en 100 mL de caldo nutritivo que se suplementó con 20 mmol/L de disolución de $MgCl_2$ (este a su vez se había dejado en crecimiento durante 24 horas a 28°C y 180 rpm). Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 8000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se desechó y la biomasa bacteriana se resuspendió en 20 mL de una disolución de 50 mmol/L $CaCl_2$ previamente colocada sobre hielo. La suspensión se dispuso en baño de hielo durante 30 minutos y las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en 2 mL de una disolución de 50 mmol/L $CaCl_2$ con glicerol al 20%. La mezcla había sido previamente colocada sobre hielo y la concentración celular se recolectó en tubos Eppendorf 200 μ L en cada uno. Estas células competentes se utilizaron de dos formas las cuales fueron utilizándolas inmediatamente después de llevar a cabo el procedimiento y la otra forma fue dejándolas conservadas a -20°C y utilizarlas al siguiente día.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Se descongeló el plásmido (mCherry pMP7604) junto con las alícuotas de 200 μ L que fueron conservadas en tubos Eppendorf a -20°C, se deben dejar descongelar lentamente en hielo y utilizar inmediatamente. Las alícuotas que se utilizaron son las del método descrito anteriormente. Se preparó un control al cual se le agregaron 5 μ L del plásmido a la suspensión de células competentes, y un testigo al cual no se le agrega el plásmido. Se colocan 30 minutos en hielo. Terminando los 30 minutos se retiran del hielo e inmediatamente se colocan 30 segundos a 42°C (se colocan en el multi block heaters). Se adiciona 1 mL de caldo nutritivo. La mezcla se dejó incubando en las siguientes condiciones que fueron dos horas a 28°C a 180 rpm. Pasadas las dos horas de incubación se procede a sembrar con varilla, 50 μ L de las dos mezclas el control (células competentes con plásmido) y el testigo (células competentes sin plásmido) en cajas de Petri, previamente preparadas de Agar nutritivo con 40 μ L de Tetraciclina 25 mg/ml y se incuban a 28°C durante 48 horas.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó en Mini Kit de Plásmido RapidPURE™, el cual está diseñado para aislar hasta 20 µg de ADN plasmídico de 1,5 mL de un cultivo bacteriano para su uso en aplicaciones rutinarias de biología molecular tales como secuenciación fluorescente y clonación.

El procedimiento, con modificaciones, fue el que se menciona a continuación.

- Centrifugar una suspensión bacteriana (1.5 mL) 10,000 rpm por 1 minuto y por 3 minutos (se cambiaron las revoluciones a 5000 rpm por 5 minutos).
- Resuspender el pellet en 50 µL de la solución Pre-Lysis Bufer.
- Añadir 100µL de Alkaline Lysis Solution.
- Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos. Invertir el tubo para mezclar. Añadir 100µL de Neutralizing Solution.
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente mezclar suavemente. Centrifugar 2 minutos a 10,000 rpm transferir el sobrenadante (fase clara) a un tubo nuevo (se necesita la fase clara desechar el pellet) y se cambiaron las revoluciones 5 minutos a 5000 rpm. Añadir 250 µL de Rapid PURE mini kit Sait solution.
- Transferir la muestra a un tubo cartridges ensamblado. Centrifugar 30 segundos a 14,000 rpm (antes dejar reposar 2 minutos), añadir 350 µL de Wash Solution.
- Centrifugar 30 segundos a 14,000 rpm vaciar el filtrado “tirar” tubo de captura y recolocar a centrifugar por 2 minutos a 14,000 rpm. Retirar el tubo filter y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo. Añadir 100 µL de agua destilada estéril o buffer TE. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm para la recolección de DNA plasmídico (MP Biomedicals). Conservar muestras a -20 °C.

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DE ADN PLASMÍDICO

Para verificar si efectivamente se había introducido el plásmido pMP7604 a la cepa bacteriana, se usó electroforesis en gel de agarosa (1%).

Para preparar el gel, se tiene el tampón TAE 50x (Tris-acetato EDTA), se preparó a 1x. Teniendo la solución 1x, se vierte en un matraz 75 ml y 0.75 gr de agarosa (1%). Posteriormente se calienta y la solución se observa transparente. Se deja enfriar hasta que alcance los 50°C aproximadamente. A partir de la solución tibia se le agregan 3 µL de bromuro de etidio o algún otro compuesto para revelar. Previamente se prepara el molde donde se va a verter el gel de agarosa, se ensambla el peine para formar los pocillos, esto es en la cámara de electroforesis. Por último, se vierte el gel y se deja polimerizar durante aproximadamente 40 minutos.

Se usan todos los elementos de seguridad para manipular el bromuro de etidio que, ya está clasificado como mutágeno de categoría 2 lo que significa que se sospecha que la exposición crónica a bromuro de etidio puede provocar daños hereditarios.

Cuando se polimerizo el gel, se retira el peine para los pocillos y el molde se coloca en la cubeta de electroforesis. Los pocillos deben estar cerca del cátodo (polo negativo color negro). Se añade tampón de electroforesis TAE, de forma que cubra bien el gel de agarosa. En el primero pocillo se depositan 10 µl de marcador de peso molecular. Se toman 15 µl del DNA plasmídico previamente aislado y se le añaden 5 µl de tampón de carga y esa mezcla preparada se deposita en el segundo pocillo. Posteriormente, se cierra la cámara de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Para finalizar se programa la fuente a las siguientes condiciones 85 voltios y se comienza a correr la electroforesis que durará unos 30-45 minutos. Una vez finalizado el proceso de la

electroforesis se retira el gel de la cubeta y se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV en el transiluminador y se realiza una fotografía de la imagen.

VISUALIZACIÓN EN MICROSCOPIO DE ENTEROBACTER SP. CPO2.8II TRANSFORMADAS CON MP7604

Para la visualización de fluorescencia se utilizó el microscopio Olympus BX51 equipado con iluminadores de luz incidente para fluorescencia (Olympus) con un filtro de excitación de 546 nm y un filtro de emisión de paso largo de 590 nm. El microscopio Olympus BX51 se utilizó con las células competentes conservadas a -20°C y después de haber realizado el procedimiento de transformación por choque térmico en la cepa bacteriana con el plásmido mCherry pMP7604 (Mesa *et al.* 2015)

RESULTADOS

Aproximadamente a las 48 horas transcurridas, se observaron que las cajas en las que se sembró el testigo (el cual no contenía plásmido) no hubo crecimiento, por el contrario, las cajas que contenían el control (contenía plásmido) se observaron pequeñas colonias de bacterias de color blanco (Figura 3 b). De la cepa transformada que se tenía en caja, se tomó una muestra en un portaobjetos se analizó en el microscopio óptico a 40X (Figura 4b) y se comparó con la muestra que se tenía de la cepa silvestre (Figura 4a), después se analizó en el microscopio Olympus BX51, en el que se observó como resultado la presencia de colonias rojas brillantes fluorescentes (Figura 5).

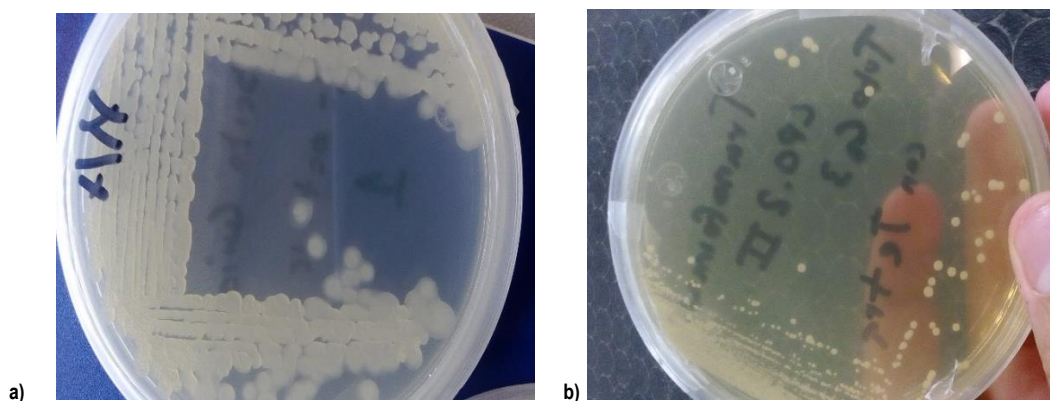


Figura 3. a) Cepa *Enterobacter* sp. CPO2.8II silvestre en agar nutritivo sin Tetraciclina y b) Cepa *Enterobacter* sp. CPO2.8II transformada en agar nutritivo con Tetraciclina 25 mg /ml se observan en las figuras colonias de bacterias de color blanco hay una clara reducción de colonias ya que no todas las bacterias captan el plásmido durante el proceso de choque térmico.

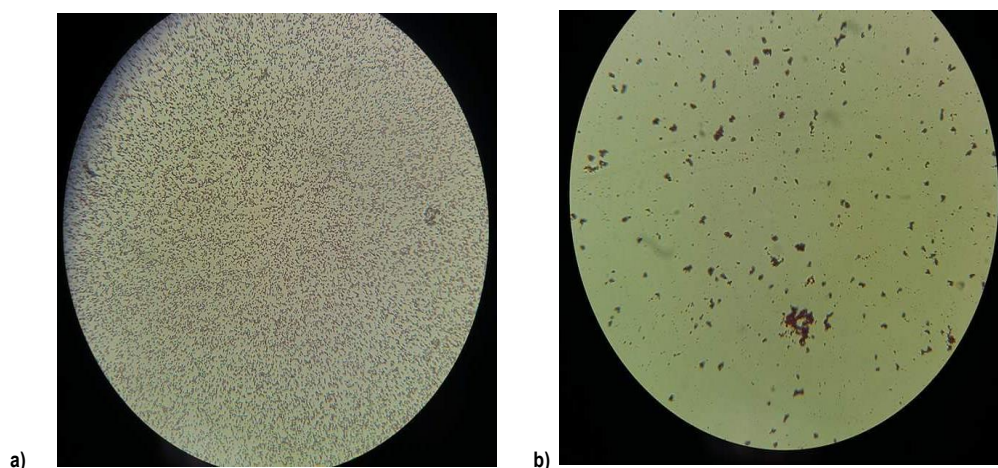


Figura 4. Muestras en un portaobjetos observadas al microscopio óptico 40X, a) Cepa *Enterobacter* sp. CPO2.8II silvestre y b) Cepa *Enterobacter* sp. CPO2.8II transformada.

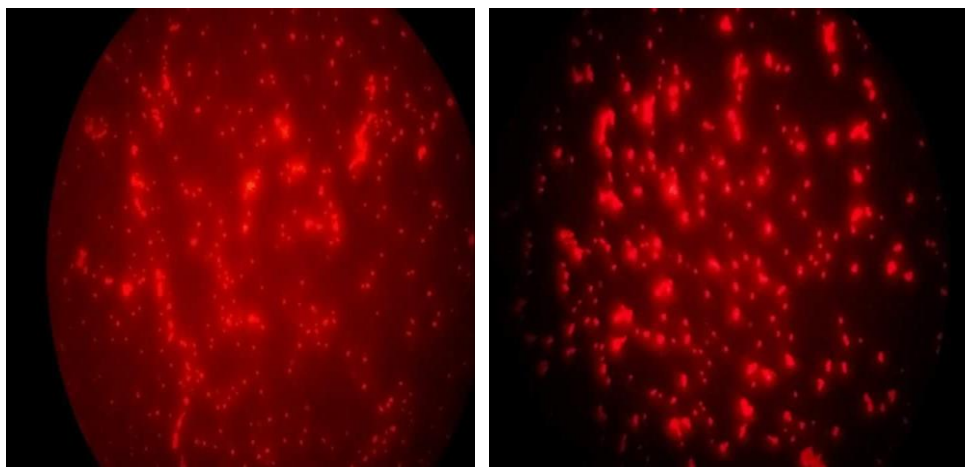


Figura 5. Análisis de *Enterobacter* sp. CPO2.8II transformada que contienen el plásmido mCherry pMP7604, las imágenes se realizaron mediante microscopia de fluorescencia. El Vector en este estudio podrían funcionar como marcador para localizar bacterias. La expresión de mCherry en bacterias Gram-negativas son un conjunto de herramientas genéticas para para estudios y en entornos naturales, especialmente de cuando la presión antibiótica no puede aplicarse eficazmente (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010)

Terminado el proceso de electroforesis se observa en el gel de agarosa, colocado en el tras iluminador, en el primer carril el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa la presencia del fragmento de mCherry que se introdujo con éxito (Figura 6), esto al considerar su peso molecular aproximado considerando el mapa genómico. Las bandas superiores son bandas inespecíficas debido a la manipulación durante el experimento.



Figura 6. Resultado de una electroforesis de ADN en gel de agarosa (1 %), en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa ADN plasmídico de la cepa CPO2.8II transformada.

DISCUSIÓN

Hoy en día, el uso de proteínas autofluorescentes como marcadores para el análisis microscópico no invasivo de procesos biológicos es un enfoque técnico exitoso bien establecido para mejorar el brillo, maduración y fotoestabilidad monomérica optimizada.

Formas de proteína roja fluorescente se han producido recientemente, de los cuales mCherry es uno de los mejores miembros (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010).

VISUALIZACIÓN DE ENTEROBACTER SP. CPO2.8II TRANSFORMADAS CON PMP7604

La cepa transformada CPO2.8II transformada con pMP7604 de acuerdo con Bredenkamp (2014) se sometió a varias pruebas para confirmar la presencia del plásmido mCherry en esta cepa.

Aproximadamente a las 48 horas transcurridas, se observaron que las cajas de Petri en las que se sembró el testigo (el cual no contenía plásmido) no hubo crecimiento, resultado que se esperaba ya que las células bacterianas son de la cepa silvestre la cual no contenía plásmido y como consecuencia no tenía resistencia al antibiótico (Tetraciclina). Por el contrario, las cajas que contenían el control (con plásmido) se observaron pequeñas colonias de bacterias, que, en comparación con la cepa silvestre (Figura 3a), el crecimiento de colonias de una cepa transformada se reduce ya que el choque de calor hace que la membrana de la bacteria sea más permeable a las moléculas de ADN, como los plásmidos. Al parecer, el choque térmico provoca la formación de poros en la membrana bacteriana, a través de los cuales pueden pasar las moléculas de ADN lo que provoca que algunas recolecten el plásmido y otras no y esto resulta que el antibiótico las mate. Cada bacteria con plásmido da lugar a una colonia o comunidad de bacterias idénticas que contiene el plásmido. (Figura 3b). Al hacer un frotis en un portaobjetos y observarlo al microscopio, se pudo notar un cambio en el tamaño y color en la morfología de la bacteria, se tenían bacilos, pero comparado con el frotis de la cepa silvestre eran de mayor diámetro y el color cambió a un rojo intenso, se hace una deducción que probablemente sea por el tamaño en pb del plásmido que se le introdujo (Figura 4).

La expresión de mCherry se analizó cualitativamente mediante microscopia de fluorescencia (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010). De la cepa transformada que se tenía en caja, se tomó una muestra en un portaobjetos y se analizó en el microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 546nm y un filtro de emisión de paso largo de 590nm, en el que en comparación con los resultados obtenidos de Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert & Bloemberg (2010) y Bredenkamp (2014) se verificó y confirmó que se introdujo con éxito el plásmido mCherry en esta cepa (Bredenkamp, 2014) mediante la presencia de colonias rojas brillantes fluorescentes (Figura 5).

GEL DE AGAROSA OBSERVADO EN EL TRANSILUMINADOR

Después de que el ADN plasmídico se extrajo de los cultivos de CPO2.8II la estructura plasmídica de pMP7604 se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). Los patrones de banda coinciden con lo que se expresa para ser visto (Bredenkamp, 2014) en geles de agarosa de acuerdo con los resultados de Yábar (2003) el cual deduce que las moléculas de ADN son visualizadas indirectamente cuando son coloreadas con bromuro de etidio, floreciendo como bandas de un color naranja frente a la luz UV. Las moléculas de ADN que son más grandes generalmente migran más retardadamente que las moléculas de menor peso. Con esto se tenía la certeza que el plásmido pMP7604, se había introducido con éxito en la cepa CPO2.8II como se observa en la (Figura 6).

TASA DE CRECIMIENTO Y ESTABILIDAD

En comparación con los resultados de (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010), la presencia del vector pMP7604 si tuvo un efecto significativo en el crecimiento en comparación con la cepa silvestre de *Enterobacter* sp. CPO2.8II se aprecia en la (Figuras 3 y 4).

La estabilidad del plásmido se ensayó cultivando en medios no selectivos (sin presión de selección de antibióticos) (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010) y en medios selectivos (con presión de selección de antibióticos) durante aproximadamente 13 generaciones (datos no mostrados). Se examinaron las colonias para la expresión de mCherry por microscopia de fluorescencia (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, & Bloemberg, 2010). La cepa CPO2.8II en los dos medios selectivo y no selectivo, no se observó pérdida del plásmido.

CONCLUSIONES

La transformación de *Enterobacter* sp. CPO2.8II con el plásmido mCherry pMP7604 dio paso al establecimiento de un protocolo completo para la inducción de la expresión de estas proteínas que permita la visualización de bacterias hidrocarbonoclastas transformadas bajo el microscopio de fluorescencia.

Se obtuvieron bacterias transformadas de *Enterobacter* sp. CPO2.8II con mCherry pMP7604, lo que da paso a la realización de ensayos in vivo en secciones delgadas de suelos contaminados con petróleo en los cuales se pueda realizar un seguimiento de la localización de esta bacteria hidrocarbonoclasta gracias a la fluorescencia emitida.

Comprobado que el plásmido es muy fotostable y con los bioensayos se corroboró que las bacterias transformadas no pierden el plásmido sin la presión del antibiótico. Se cree que esta técnica tiene mejor eficacia al aplicarla en las secciones delgadas, que los fluorocromos que se usan comúnmente el naranja de acridina y el calcoflúor los cuales pierden fluorescencia al realizar las secciones delgadas.

REFERENCIAS

- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Rojano, B., Ruiz, O., y Cardona, S. (2012). Biorremediación de un suelo con Diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15(1), 27-40.
- Bredenkamp, J. (2014). Characterization of tolerance to bacterial wilt in the model plant *Arabidopsis*. Tesis Maestría, University of Pretoria, Department of Plant Science in the Faculty of Natural and Agricultural Science, Pretoria. Obtenido de <http://repository.up.ac.za/handle/2263/40348>
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., & Delgadillo, J. (2015). Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos del Petróleo. Estado de México: Colegio de Postgraduados.
- González, T. (2014). Interacción minerales-microorganismos-metales pesados en antrosolos de origen volcánico. Tesis Maestría, Colegio de Postgraduados, Estado de México. Obtenido de COLPOS DIGITAL: http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/2541/Gonzalez_Vargas_T_MC_Edafologia_2014.pdf?sequence=1
- Lagendijk, E., Validov, S., Lamers, G., de Weert, S., & Bloemberg, G. (2010). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. (C. Jeff, Ed.)
- Lladó, S. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona. Obtenido de http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/98247/SLLF_TESIS.pdf?sequence=1
- Mesa, J., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. (22 de diciembre de 2015). Endophytic Cultivable Bacteria of the Metal Bioaccumulator *Spartina maritima* Improve Plant Growth but Not Metal Uptake in Polluted Marshes Soils. (Y. Ma, & University of Coimbra, Eds.) Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733985>
- MP Biomedicals, L. (s.f.). MP Biomedicals. Obtenido de MP Biomedicals: <http://www.mpbio.com/newsletter.php>
- Olympus. (s.f.). Obtenido de Olympus:

http://www.olympusmexico.com.mx/spanish/seg/seg_product_detail_esp.asp?q=665&d=2&s=14&c=54

- Ortinez, O., Ize, I., & Gavilan, A. (octubre-diciembre de 2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 83-92. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/539/53906906.pdf>
- Ramírez, M. (2014). Microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo aislados de la rizosfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación. Tesis Doctoral, Colegio de Postgraduados, Estado de México. Obtenido de <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/2332>
- Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., & Fando-Calzada, R. (mayo-agosto de 2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(2). Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181227534009.pdf>
- Volke, T., & Velasco, J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: Jiménez Editores e Impresores, S.A. de C.V. Obtenido de <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/372.pdf>
- Yábar, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Instituto Nacional de Salud, División de Biología Molecular, Lima. Obtenido de http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1051_INS-NT38.pdf

Este artículo puede citarse de la siguiente forma:

Citación estilo APA sexta edición

Curiel Ruiz, V.A., Delgadillo Martínez, J. & Moreno Medina, D.A. (septiembre-diciembre de 2017). Bacterias hidrocarbonoclastas modificadas genéticamente para emplearlas como herramienta de visualización. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 3(3), 33-42.

Citación estilo Chicago decimoquinta edición

Curiel-Ruiz, Víctor Alberto, Delgadillo-Martínez, Julián & Moreno-Medina, David Antonio. Bacterias hidrocarbonoclastas modificadas genéticamente para emplearlas como herramienta de visualización. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 3 No. 3 (septiembre-diciembre de 2017): 33-42.

Citación estilo Harvard Anglia

Curiel Ruiz, V.A., Delgadillo Martínez, J. & Moreno Medina, D.A., 2017. Bacterias hidrocarbonoclastas modificadas genéticamente para emplearlas como herramienta de visualización. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, septiembre-diciembre, 3(3), pp. 33-42.

Citación estilo IEEE

[1] V.A. Curiel-Ruiz, J. Delgadillo-Martínez y D.A. Moreno-Medina. Bacterias hidrocarbonoclastas modificadas genéticamente para emplearlas como herramienta de visualización. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, vol. 3 No. 3, pp. 33-42, septiembre-diciembre de 2017.