



INFORME FINAL PROYECTOS DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA PASANTÍAS TECNOLÓGICAS

1.- ANTECEDENTES GENERALES

Código Proyecto	207-6457
Título del Proyecto	BIOTECNOR-PASANTÍA TECNOLÓGICA EN EL USO DE MICROARREGLOS DE ADN APLICADOS A PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN-ESPAÑA
Entidad Supervisora	EUROCHILE
R.U.T. Entidad Supervisora	72.151.100-6
Fecha de Salida	31-AGOSTO-2007
Fecha de Llegada	08-OCTUBRE-2007
Fecha Elaboración Informe	OCTUBRE-2007

2.- INFORME TECNICO DEL PROYECTO DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

2.1 Síntesis del proyecto

2.1.1 Proyecto planificado

- Resumen del proyecto y sus objetivos planificados.

El proyecto fue generado por la empresa Biotecnor Ltda., la cual cuenta como principales clientes a las compañías mineras de la II Región. El proyecto se elaboró en el marco de las actividades realizadas por el Nodo de Servicios Medio Ambientales y Biotecnológicos de la Corporación para el Desarrollo Productivo de la II Región de Antofagasta contando con el apoyo y supervisión de EuroChile como ESN.

El proyecto se sustentó en base a que en la actualidad la industria de la minería se encuentra demandando análisis y tecnologías para poder entender de mejor forma las funciones metabólicas que presentan las comunidades microbianas en los procesos de biolixiviación, y de esta manera poder identificar actividades metabólicas claves que ayuden optimizar estos procesos.

La manera en que importantes centros de investigación a nivel mundial identifican funciones metabólicas a nivel molecular es mediante el estudio de la expresión global de genes utilizando Microarreglos de ADN (DNA Microarrays). Esta técnica es una colección microscópica de "spot" con secuencias de ADN de un determinado organismo, que generalmente representan genes diferentes, y que se encuentran impresos mediante uniones covalentes a distintas matrices sólidas. Los análisis de Microarreglos de ADN están basados en lo estricto de las hibridaciones de los ácidos nucleicos y en la detección mediante técnicas de fluorescencia. Los Microarreglos de ADN son usados comúnmente para monitorear los niveles de expresión de miles de genes al mismo tiempo o para un análisis genómico comparativo. En los últimos años, los Microarreglos de ADN pasaron a ser una tecnología poderosa para estudios de genómica funcional que actualmente es utilizada ampliamente en el monitoreo de la expresión de genes bajo diferentes condiciones de crecimiento, la detección de mutaciones específicas en secuencias de ADN y en la caracterización de microorganismos en muestras ambientales. Por lo tanto, esta nueva tecnología ha revolucionado los análisis genéticos en sistemas biológicos, y en un futuro se



espera que esta tecnología revolucione el análisis de estructuras, funciones y dinámicas de comunidades microbianas.

Este proyecto se planteó con la intención desarrollar e implementar a Biotecnor Ltda. técnicas avanzadas en biología molecular como son la amplificación de ARN y los Microarreglos de ADN. Hasta la fecha este tipo de técnicas no han sido aplicadas en laboratorios chilenos que trabajen con muestras provenientes de procesos de biolixiviación o desde ambientes extremos. Estas técnicas ofrecen expectativas de desarrollo de nuevos métodos de análisis de funciones metabólicas de los microorganismos presentes en procesos de biolixiviación e industriales, lo que para Biotecnor Ltda. significará un aumento de los servicios ofertados y la apertura de nuevas líneas de desarrollo. Por lo tanto, se planteó como objetivo general incorporar a Biotecnor Ltda. herramientas potentes de última generación, como es el caso de los Microarreglos de ADN, que puedan ser utilizadas en el estudio de la expresión genética en comunidades microbianas involucradas en proceso de biolixiviación.

Los objetivos específicos planificados fueron los siguientes:

1. Incorporación de nuevas técnicas de extracción y amplificación de ARN desde muestras ambientales en Biotecnor Ltda.
2. Incorporar el desarrollo de técnicas de expresión global de genes como los Microarreglos de ADN en Biotecnor Ltda.
3. Realizar pruebas de expresión diferencial de genes con el Microarreglo de ADN que contiene el genoma de *Leptospirillum ferrooxidans* que se encuentra disponible en el Centro de Astrobiología.
4. Relacionar las herramientas y resultados obtenidos de esta pasantía con las técnicas de monitoreo de comunidades microbianas que actualmente son desarrolladas por la empresa en el marco del Proyecto Fondef D04I1169. Sin embargo, cabe señalar que, este proyecto de pasantía no estaba contemplado en el proyecto Fondef.
5. Iniciar un vínculo estable de colaboración entre el Centro de Astrobiología y Biotecnor Ltda.

2.1.2 Proyecto Ejecutado

- Porcentaje de cumplimiento de los objetivos proyecto.

Los objetivos se cumplieron en un 100 %. Se trabajó con nuevas técnicas de extracción y amplificación de ARN, las cuales se están incorporando actualmente a Biotecnor Ltda. Se desarrollaron técnicas de expresión global de genes mediante Microarreglos de ADN, las cuales necesitan un equipamiento de alto costo, por lo tanto actualmente en el Centro no se pueden desarrollar este tipo de tecnologías, pero se están gestionando fondos para poder adquirir alguno de estos equipos. Se realizaron las pruebas de expresión con el Microarreglo de ADN de *Leptospirillum ferrooxidans*, para esto se utilizaron varias muestras provenientes de la pila de lixiviación de sulfuros de Escondida. Las herramientas y resultados obtenidos se están relacionando con los datos que se han desarrollado hasta el momento en el marco del proyecto Fondef D04I1169. Finalmente, se inició la colaboración con Centro de Astrobiología (Madrid, España), la cual será importante para poder desarrollar estas tecnologías en Biotecnor Ltda. Contacto: Víctor Parro García, e-mail: parrogv@inta.es.

- Logros destacables de la pasantía.

Por un lado, Biotecnor Ltda. es una empresa Biotecnológica que cuenta como principales clientes las Empresas Mineras de la región, las cuales se encuentran demandando variados tipos de análisis para entender de mejor forma la composición y las funciones metabólicas que



presentan las comunidades microbianas en el proceso de biolixiviación. Por otro lado, Biotecnor Ltda. se encuentra trabajando en un Proyecto Fondef D0411169 directamente relacionado con Minera Escondida, que tiene relación con el monitoreo de comunidades microbianas y en la expresión diferencial de genes de una pila industrial de biolixiviación de sulfuros.

Tomando lo anterior como desarrollos y futuras necesidades, la empresa tiene como uno de los objetivos principales capacitarse en tecnología de punta en cuanto a técnicas de genómica y proteómica, de esta forma poder entender y optimizar los procesos de extracción de minerales, las cual es una de las más importantes necesidades de los clientes que presenta Biotecnor Ltda. Por lo tanto, uno de los logros de la pasantía fue la capacitación en una técnica potente de última generación para el estudio de expresión diferencial de genes (Microarreglos de ADN). El manejo de técnicas en el área de la genómica y la proteómica permitirá a Biotecnor crecer como empresa, y además podrá contribuir a las necesidades de sus clientes en el área de optimización de procesos biomíneros.

Otro de los logros de la pasantía fue la utilización de un Microarreglo de ADN de *Leptospirillum ferrooxidans*, con muestras provenientes de una pila de lixiviación de sulfuros de la Mina Escondida. A estas muestras se les extrajo ARN, y se hibridaron con el Microarreglo de *Leptospirillum ferrooxidans*, posteriormente se obtuvo la expresión diferencial de genes entre las muestras que se analizaron. Actualmente se están analizando los genes identificados y se están relacionando con los resultados que se han obtenido hasta el momento en marco del proyecto Fondef D0411169.

Finalmente, uno de los logros fundamentales para que este tipo de tecnologías se comiencen a desarrollar en Biotecnor Ltda. fue establecer un vínculo de colaboración con el Centro de Astrobiología de Madrid (España), con el cual se están planeando actualmente futuros proyectos de Investigación y Desarrollo. Esta colaboración es de gran importancia para nuestra empresa debido a el Centro de Astrobiología actualmente presenta un importante grupo de investigación interdisciplinaria, lo que ha dado como resultado el diseño de una amplia gama de técnicas potentes utilizadas en investigación científica. Además, es el primer Centro de investigación no estadounidense asociado al NASA Astrobiology Center (NAI). Este centro tiene la característica de ser multidisciplinario, en cual interaccionan expertos de distintas áreas para intercambiar conocimiento, diseñar experimentos y construir instrumentos avanzados que requieren el dominio de varias disciplinas. El modelo de estudio en este laboratorio es una bacteria extremófila, *Leptospirillum ferrooxidans*, la cual por un lado es representativa de una de las formas de vida más primitivas; y por otro lado existen muchos estudios en los cuales se demuestra que esta bacteria es uno de los importantes microorganismos que forman parte del consorcio bacteriano involucrado en los procesos de biolixiviación de minerales. Por lo tanto existe un vínculo directo entre las investigaciones de este centro y las principales actividades de la empresa Biotecnor Ltda. que son asesorías a las empresas mineras de la región, especialmente enfocadas al área de la biolixiviación de minerales.

2.2 Plan de trabajo

2.2.1 Plan del trabajo planificado

- Especificar actividades programadas del proyecto, indicando la agenda de desarrollo y el programa de pasantía. Se debe señalar además, el plazo de ejecución y la fecha de entrega del Informe Final.

La pasantía tuvo una duración de un poco más de 4 semanas (Desde el 6 de Septiembre al 7 de Octubre) y se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Molecular (Figura 1) perteneciente al Centro de Astrobiología de Madrid (Figura 2), España. El plan de trabajo de la pasantía estuvo compuesto de tres etapas: una primera etapa que corresponde a procesamiento de ARN, una segunda etapa que involucra marcaje del ARN e hibridaciones en el Microarreglo de ADN y



finalmente una tercera etapa de análisis de resultados utilizando la base de datos del Laboratorio de Ecología Molecular.

La pasantía tuvo una duración de un poco más de 4 semanas, y se realizó bajo la tutela del Dr. Víctor Parro, y en un inicio contempló las siguientes actividades:

Semana 1 (6-16 de Septiembre): Se trabaja en la extracción, comprobación de la calidad y amplificación del ARN de las muestras obtenidas desde sitios de la pila de lixiviación de sulfuros de escondida, que muestren diferencias en parámetros ambientales y en sus capacidades oxidantes.

Semana 2 (17-23 de Septiembre): Posterior a las extracciones de ARN y sus amplificaciones, se realizan los marcajes de estos con Cy5-dUTP o Cy3-dUTP utilizando el kit de marcación de cADN de Amersham Biosciences. Al mismo tiempo se realizará un entrenamiento en los equipos de hibridación y Microarreglos de ADN.

Semana 3 (24-30 Septiembre): Se realizará la hibridación de los cADN marcados obtenidos en el paso anterior con el Microarreglo de ADN que contiene impresa la librería genética de *Leptospirillum ferrooxidans*.

Semana 4 (1-7 de Octubre): Se realizará la visualización, análisis de los datos, obtención de secuencias y el posterior análisis de estas en la base de datos del genoma de *Leptospirillum ferrooxidans* presente en el Laboratorio de Ecología Molecular.

2.2.2 Plan del trabajo ejecutado

- Grado de cumplimiento del plan de trabajo, si es distinto al 100% explicar por que, y señalar fecha de realización de talleres, actividades y contenidos de las mismas.

El plan de trabajo fue bastante similar al descrito anteriormente, se cumplió en un 100 %, solo los tiempos estimados en que se realizaron las actividades tuvieron algunos cambios. Se describen las actividades realizadas en la pasantía:

6-18 Septiembre: Se trabajó en la extracción de RNA de 3 tres muestras (franja 5, franja 8 y franja 10) provenientes de la pila de lixiviación de sulfuros de la Mina Escondida. La extracción de ARN se realizó con el RNeasy Mini kit de Quiagen y algunas modificaciones de este. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ARN con un nanodrop y se verificó su calidad con un bioanalizador (Figura 3). Debido a las condiciones ambientales en las cuales se encuentran este tipo de microorganismos utilizados en biolixiviación, los niveles de RNA obtenidos son muy bajos, por lo tanto se amplificó el RNA con un protocolo desarrollado en el laboratorio del Dr. Víctor Parro, el cual está basado en un kit de Ambion (Message Amp™ II aRNA Amplification kit RNA amplification for arrays analysis). Posterior a la amplificación, el ARN se vuelve a cuantificar y a verificar su calidad. Cabe destacar que esta amplificación del ARN se realiza para tener una alta cantidad de RNA para poder marcarlo con los fluoróforos e hibridar con el Microarreglo de ADN.

19-21 Septiembre: Posterior a las extracciones de ARN y sus amplificaciones, se realizaron los marcajes. Para esto se utilizó el kit de marcación de cADN de Amersham Biosciences, los RNAs se deben pasar a cADN mediante un Transcriptasa Reversa, y en este paso se incorporan los nucleótidos marcados a las muestras (Cy5-dUTP o Cy3-dUTP). Al mismo tiempo se realizaron capacitaciones con los equipos de hibridación y lector de Microarreglos de ADN.

24-26 Septiembre: Se realizó la hibridación de los cADN marcados obtenidos en el paso anterior con el Microarreglo de ADN que contiene impresa la librería genética de *Leptospirillum ferrooxidans*, para poder observar lo genes que aumentaron o disminuyeron su expresión en las muestras analizadas.



27-28 Septiembre: Se realizó la lectura de los Microarreglos de ADN de *Leptospirillum ferrooxidans*, que fueron hibridados con las distintas muestras de la pila de lixiviación de sulfuros de la Mina Escondida (Figura 4).

29 Septiembre - 6 Octubre: Se realizó el análisis de las lecturas de los Microarreglos. Para esto se deben tomar los datos obtenidos y normalizarlos con la ayuda del programa GenePix Pro 6.0. Después de normalizar los datos, los genes que aumentaron o disminuyeron su expresión se identificaron en la base de datos del genoma de *Leptospirillum ferrooxidans* que tiene actualmente el Laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Astrobiología.

Existen dos actividades que se realizaron y no estaban en el plan de trabajo:

La primera es la utilización de un Microarreglo de biodiversidad que recientemente ha desarrollado el grupo del Dr. Víctor Parro, y que será publicado en los próximos meses en una revista de alto impacto científico (Environmental Microbiology). Este es un Microarreglo de oligonucleótidos que puede ser utilizado para monitorear la diversidad microbiana en ambientes ácidos, que se desarrolló con sondas conocidas que reconocen microorganismos acidófilos, y que actualmente se está utilizando para monitorear la biodiversidad en Río Tinto, España. No se pueden anexar fotos debido a que esta técnica desarrollada en el Centro de Astrobiología es confidencial hasta que sea publicada en los próximos meses.

La segunda actividad fue una visita al Río Tinto en las cercanías de Sevilla (Figura 5). Esta actividad fue programada por el personal del Laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Astrobiología, para mostrar las condiciones ambientales en las cuales están desarrollando sus líneas de investigación, de esta forma comparar sus experiencias con los desarrollos que actualmente Biotecnor Ltda. presenta en área de la biominería. Las minas del Río Tinto han sido históricamente reconocidas como una de las más importantes de España. Se encuentran en una localidad cercana a la provincia de Huelva, Andalucía, España. El ambiente desarrollado en el Río Tinto ha sido uno de los blancos de estudio del Centro de Astrobiología de España en conjunto con la Nasa, debido a que las condiciones ambientales que presenta, tales como el color rojo de sus aguas debido a los metales, la densidad y la escasez de oxígeno, son similares a las que se han detectado en Marte, de esta manera el estudio de los organismos presentes en este río puede dar una señal sobre la existencia de vida en otros planetas.

Al regreso de la pasantía, se ha trabajado en asociar la expresión diferencial obtenida desde genes correspondientes a *Leptospirillum ferrooxidans* con los parámetros ambientales de la pila de biolixiviación de sulfuros y con las técnicas de monitoreo de comunidades microbianas que actualmente son desarrolladas por la empresa en el marco del Proyecto Fondef D04I1169.

Además se iniciará la implementación de técnicas relacionadas con la expresión diferencial de genes como los Micro- y Macroarreglos en Biotecnor Ltda., lo cual es uno de los objetivos finales planteados en el proyecto Fondef D04I1169.

2.3 Resultados y Conclusiones de la pasantía

- Comentar en términos generales y específicos.

En términos generales la pasantía tuvo un impacto fuerte en varios aspectos, dentro de los que se destacan la visita a un Centro de excelencia en España. Este es el primer Centro de investigación no estadounidense asociado al NASA Astrobiology Center (NAI), que tiene la característica de ser multidisciplinario, en el cual interaccionan expertos de distintas áreas para intercambiar conocimiento, diseñar experimentos y construir instrumentos avanzados que requieren el dominio de varias disciplinas. Por lo tanto, uno de los logros fundamentales para que este tipo de tecnologías se comiencen a desarrollar en Biotecnor Ltda. fue establecer un vínculo de colaboración con el Centro de Astrobiología con el cual se están planeando actualmente



futuros proyectos de Investigación y Desarrollo. Otro de los aspectos que se destacan es que en el desarrollo de la pasantía se realizaron actividades que no se contemplaban dentro de los objetivos y el plan de trabajo, como lo fue el uso del Microarreglo de Biodiversidad que desarrolló recientemente el grupo del Dr. Víctor Parro y la visita al río Tinto, lugar en cual el Centro de Astrobiología está desarrollando sus actividades de investigación.

En términos específicos se obtuvieron resultados satisfactorios, tales como la extracción de ARN desde muestras de una pila de lixiviación, la comprobación de la calidad y su posterior amplificación. Actualmente, estas técnicas se están tratando de desarrollar en Biotecnor Ltda. Además, no sólo se desarrollaron conocimientos en técnicas de expresión global de genes como los Microarreglos de ADN, si no que también se obtuvieron resultados positivos con el Microarreglo *Leptospirillum ferrooxidans* que se encuentra disponible en el Centro de Astrobiología. Esto se vio reflejado en que las muestras provenientes de la pila de lixiviación hibridaron en forma positiva con el Microarreglo disponible, y obtuvimos resultados de expresión diferencial de genes entre las muestras que analizamos. Esto es importante de destacar, debido a que el Microarreglo de ADN disponible corresponde a la secuencia del genoma de un solo microorganismos, en cambio las muestras provenientes de la pila industrial presentan una comunidad diversa en microorganismos y en abundancia de ellos, por lo tanto puede que la cantidad de RNA obtenido desde las muestras no sea principalmente perteneciente a *Leptospirillum ferrooxidans* si no que a otros microorganismos, por lo tanto este tipo de condiciones pudo haber condicionado en que la pasantía tuviera resultados positivos o negativos.

Finalmente, los buenos resultados obtenidos de esta pasantía se están relacionando con las técnicas de monitoreo de comunidades microbianas que actualmente son desarrolladas por la empresa en el marco del Proyecto Fondef D04I1169.



Figura 1. Foto del área donde se encuentran los equipos para el desarrollo de los Microarreglos de ADN en Laboratorio de Ecología Molecular.



Figura 2. Fotos del Centro de Astrobiología perteneciente al Instituto Nacional de Técnicas Aeroespaciales (INTA), Madrid, España.



Figura 3. Bioanalizador utilizado en el Laboratorio de Ecología Molecular, utilizado para determinar la concentración y calidad del ARN.



Figura 4. Lector de Microarreglos (izquierda). Resultado obtenido al comparar RNA desde la franja 10 y la franja 8 de la pila de lixiviación (derecha). Los puntos en rojo son los genes que aumentan su expresión en la franja 10 y los puntos verdes son los genes que aumentan su expresión en la franja 8.



Figura 5. Visita al Rio Tinto en Andalucía, España. La visita fue en el marco del trabajo que realiza el Centro de Astrobiología, y que tiene relación directa con las actividades y ambientes que son analizados en los proyectos de Biotecnor Ltda.



Víctor Parro García
Título: Biólogo experto en Microbiología Molecular
E-mail: parrogv@inta.es
Tel: 91 5201071
Fax: 91 5201074

Fecha/lugar de nacimiento: 17 de mayo de 1965 en Villanueva de Ávila (Ávila). España.
El Dr. Víctor Parro se licenció (1988) y doctoró (1994) en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular) por la universidad Autónoma de Madrid. Su campo de experiencia es la microbiología molecular. Ha utilizado la mayoría de las técnicas de biología molecular, y cuenta con gran experiencia en el análisis de la expresión génica tanto a nivel de RNA como de proteínas en bacterias Gram-positivas (*Streptomyces* and *Bacillus subtilis*) y Gram-negativas. Ha participado muy activamente en diversos proyectos europeos de gran relevancia científica, como la secuenciación del primer genoma de una bacteria Gram-positiva (*B. subtilis*), o el estudio de la función de los genes que se secuenciaron. También ha trabajado en proyectos de estudios de biodiversidad con empresas tales como Merck Sharp & Dhome y Repsol S.A. Es co-inventor de varias patentes de ámbito mundial, entre las que se incluyen: un método para la sobre-producción y purificación de una agarasa de origen bacteriano (Nº ES2117591), varias sondas de ADN para la identificación específica de Actinomicetos (Nº. WO9935285, WO0123609, WO0123608, WO9914361), un plásmido para la sobre-expresión y secreción de proteínas en *B. subtilis* (P9902652), un método para el diseño de terapias personalizadas basadas en la detección de genomas minoritarios en cuasiespecies virales mediante microarrays de ácidos nucleicos (WO0183815), un método y aparato para la detección de sustancias o analitos a partir del análisis de una o varias muestras (Nº de solicitud P200301292), o un método y kit para la detección e identificación de estirpes de *Escherichia coli* diarreagénicos (Nº de solicitud P.200503220). Ha codirigido una tesis doctoral y ha supervisado en trabajo de laboratorio de varios estudiantes. Ha sido el responsable de la adquisición y puesta a punto de la tecnología de microarrays de ADN/proteínas en el CAB, además de montar y poner en marcha el laboratorio de Ecología Molecular del CAB. Es el investigador principal de varios proyectos: Mecanismos moleculares de la adaptación a ambientes extremos en bacterias: Identificación de genes y rutas metabólicas implicadas en el metabolismo del hierro y altas concentraciones de metales en la bacteria acidófila *Leptospirillum ferrooxidans*; Desarrollo de ensayos de microarrays para la identificación de biomarcadores en Astrobiología, y Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico basados en microarrays de ADN/anticuerpos en el marco de la red nacional compuesta por 9 grupos y que lleva por título: Colired-O157: Patogénesis, diagnóstico y tipado molecular de *Escherichia coli* VEROTOXIGÉNICOS (ECVT) O157:H7 y de otros serotipos, financiada por el Instituto de Salud Carlos III.

Centros en los que ha trabajado:

- Posdoctoral. Centro de Astrobiología (CAB). INTA-CSIC. Madrid. Desde Feb. 2000.
- Posdoctoral. Centro Nacional de Biotecnología (CNB). CSIC. Madrid. 1994-2000.
- Postdoctoral. Department of Microbiology. University of Newcastle upon Tyne. Reino Unido. 1995-1996.
- Predoctoral. Centro Nacional de Biotecnología (CNB). CSIC. Madrid. 1991-94.
- Predoctoral. Department of Microbiology. University of Newcastle upon Tyne. Reino Unido. 1993-1994.
- Predoctoral. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO). CSIC-UAM. Madrid. 1988-91.
- Predoctoral. Centro de Investigaciones Biomédicas. Madrid. 1988-88.



Publicaciones más relevantes:

- M. Moreno-Paz and V. Parro (2006). Environ Microbiol (en prensa)
- Garrido, P., Blanco, M., Moreno-Paz, M., Briones, C., Dhabí, G., Blanco, J., Blanco, J. and Parro, V. (2006). Clin Chem 52 (2)
- F. Velázquez, V. Parro and V. de Lorenzo (2005). Mol. Microbiol. 57 (6), 1557-1569.
- V. Parro, J.A. Rodríguez-Manfredi, C. Briones, C. Compostizo, P.L. Herrero, E. Vez, E. Sebastián, M. Moreno-Paz, M. García-Villadangos, P. Fernández-Calvo, E. González-Toril, J. Pérez-Mercader, D. Fernández-Remolar, J. Gómez-Elvira (2005). Planetary and Space Science 53:729-737.
- Briones, C., Mateo-Martí, E., Gómez-Navarro, C., Parro, V., Román, E., Martín-Gago, J.A. (2004). Phys. Rev. Lett. 93:208103-1-4
- Parro, V., and Moreno-Paz, M. (2004). Res. Microbiol. 55:703-9.
- Parro, V., and Moreno-Paz, M. (2003). Proc Natl Acad Sci U S A 100:7883-7888.
- Palacin A, Parro V, Geukens N, Anne J, Mellado RP. (2002). J Bacteriol 184: 4875-4880.
- Geukens, N., Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Schacht, S., Schaerlaekens, K., Parro, V., Bron, S., Engelborghs, Y. Mellado, R.P., and Anné, J. (2001). J Bacteriol 183:4752-4760.
- Nick Geukens, Victor Parro, Luis A. Rivas, Rafael P. Mellado and Jozef Anné (2001). Arch Microbiol 176: 377-380
- Rivas L. A., Parro V., Moreno-Paz M. & Mellado R. P. (2000). Microbiology 146, 2929-2936.
- Hernández, A., Figueroa, A., Rivas, L.A., Parro, V. and Mellado R.P. (2000). Microbiology 146, 823-828.
- Parro, V., Schacht, S., Anné, J. and Mellado, R. P. (1999). Microbiology. 145, 2255-2263.
- Parro, V., Mellado, R.P. and Harwood, C.R. (1998). 158, 107-113.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Parro, V., et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature 390, 249-256.
- Parro, V., Vives, C., Gòdia, F. and Mellado, R.P. (1997). Journal of Biotechnology 58, 59-66.
- Parro, V., San Román, M., Galindo, I., Purnelle, B., Bolotin, A., Sorokin, A. and Mellado, R.P. (1997). Microbiology. 143, 1321-1326.