

ARTÍCULOS

Herramientas cromatográficas en estudios de ecología microbiana.

Marta Lores⁽¹⁾,*, Jorge Domínguez⁽²⁾, María Gómez-Brandón⁽³⁾, Gerardo Álvarez-Rivera⁽¹⁾, María Llompart⁽¹⁾, Carmen García-Jares⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas (LIDSA)

Dpto. Química Analítica. Facultad de Química. Campus VIDA-USC

Santiago de Compostela. E-157821

⁽²⁾ Departamento de Ecoloxía e Bioloxía Animal, Universidade de Vigo, E-36310 Vigo, Spain

⁽³⁾ Institute of Microbiology, Technikerstrasse 25d, University of Innsbruck, 6020

8 Innsbruck, Austria

*marta.lores@usc.es, Tel: +34-881-814-386, Fax: +34-981-595-012

RESUMEN

La Química Analítica puede considerarse una disciplina “solucionadora de problemas”. Este enfoque implica retos constantes a los que sólo se puede hacer frente con una base sólida en técnicas de extracción y de separación. En esta línea, los químicos analíticos, y particularmente los cromatografistas, han establecido todo tipo de colaboraciones con ecólogos, microbiólogos y biólogos de muchos otros ámbitos. De hecho, las técnicas cromatográficas han resultado ser herramientas bioanalíticas extremadamente útiles para resolver problemas en todos esos campos; principalmente en sus combinaciones con la espectrometría de masas, pero también utilizando combinaciones instrumentales más convencionales. En este artículo, mostraremos una selección de ejemplos para ilustrar cómo se han utilizado diferentes estrategias cromatográficas para esclarecer cuestiones ecológicas no resueltas, fundamentalmente en el ámbito de la ecología química microbiana. Dichas estrategias analíticas implican la identificación y determinación de biomarcadores microbianos, ya sean constituyentes estructurales (ejemplificados por los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas de bacterias y hongos) o metabolitos (ilustrados por el seguimiento de MVOCs –compuestos orgánicos volátiles de origen microbiano- generados por los microorganismos durante sus procesos metabólicos). Cada sección comienza con una breve introducción de la aplicación correspondiente, seguida de la discusión de diferentes casos de estudio, incluyendo una recapitulación de la metodología analítica propuesta.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de métodos de separación e identificación en el contexto de la Química Analítica puede contribuir a encontrar respuestas a cuestiones importantes en

estudios ecológicos. La idea principal subyacente es la relación entre la cromatografía y la ecología química. La ecología química es un área de investigación interdisciplinar entre la química y la biología que abarca el aislamiento, la identificación, la síntesis y la biosíntesis de semioquímicos (compuestos químicos emitidos por un organismo que provocan una respuesta fisiológica o de comportamiento en otro organismo de la misma o diferente especie) (Mori, 2013; Pickett, 2006). Las feromonas son semioquímicos que difunden información entre individuos de una misma especie, mientras que los aleloquímicos son semioquímicos utilizados para la comunicación entre individuos de diferentes especies (Pickett, 2006). Así, la atracción y la comunicación entre seres vivos implican frecuentemente la detección de “infoquímicos” específicos y, consecuentemente, las estrategias de supervivencia eficaces de las especies se diseñan sobre la base de la ecología química.

La cromatografía de gases (GC) es esencial para la investigación en ecología química debido a su excelente poder de separación, sensibilidad y detección universal, especialmente cuando se combina con detectores de espectrometría de masas. Jones y Oldham (1999) revisaron el análisis de feromonas por cromatografía de gases; desde entonces, las aplicaciones cromatográficas en el campo de la ecología química se han extendido en la misma medida en que han evolucionado las técnicas instrumentales de separación y detección.

Se han identificado varios miles de feromonas y compuestos relacionados, a menudo en cantidades del orden de nanogramos o incluso inferiores utilizando detectores específicos como el detector de electroantenograma (GC-EAD) (Millar, 2012) que sirve para determinar respuestas electrofisiológicas. Los compuestos, volátiles y no-volátiles, liberados por bacterias se pueden identificar y cuantificar mediante GC-MS, LC-MS, pirólisis-GC-MS y

MALDI-TOF. El uso de la cromatografía líquida (LC) en ecología química es todavía más importante, ya que la disponibilidad de instrumentación acoplada a detectores convencionales -normalmente UV-Vis y fluorescencia- está mucho más extendida en laboratorios no estrictamente químicoanalíticos. Es más, hay sistemas modelo, críticos en el desarrollo de teorías en ecología química y coevolución, como las cardenolidas –toxinas esteroideas- que se monitorizan de modo habitual por HPLC (Agrawal et al., 2012). Por último, la configuración LC-MS-MS se ha aplicado al análisis de algunas moléculas-señal (Quorum-Sensing Signaling Molecules – QSSMs), moléculas difusibles de bajo peso molecular que actúan como un medio de comunicación intercelular para coordinar comportamientos bacterianos, tales como la producción de metabolitos secundarios, el desarrollo de biopelículas, la motilidad y la virulencia (Ortori et al., 2011; Williams et al., 2007).

En definitiva, el mayor interés de este planteamiento es poner de relieve la conexión entre los químicos analíticos y los (micro)biólogos para resolver problemas en ámbitos científicos antes considerados independientes, pero cuya frontera es cada vez más tenue. En este trabajo, se muestran algunos ejemplos de este tipo de cooperación entre cromatografistas e investigadores de los campos de la biología animal y la microbiología, que trabajan conjuntamente en líneas de investigación integradas.

ECOLOGÍA QUÍMICA MICROBIANA

Las bacterias representan el dominio más diverso de la vida en la Tierra, con miembros que ocupan casi todos los nichos naturales. Además, las bacterias sustentan grandes cadenas alimentarias al ser capaces de convertir distintas fuentes de energía en biomasa para otros organismos gracias a sus diversas capacidades metabólicas. El estudio de la composición y la ecología de los ecosistemas microbianos es de vital importancia, no sólo para la comprensión de sus roles funcionales, sino también para el desarrollo de herramientas de predicción que permitan una gestión eficiente de los recursos (Eren et al., 2013). En consecuencia, no existe ninguna subdisciplina de la ecología química ajena a la creciente concienciación sobre la importancia de los microorganismos en todos los ámbitos. La ecología química microbiana es un campo de investigación en expansión, en el que se hace hincapié en la diversidad de los compuestos químicos de origen microbiano y en la necesidad de una mejor comprensión de su producción y de su metabolismo (Romeo, 2013).

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) puede aplicarse a la determinación en múltiples matrices de los llamados biomarcadores químicos, que pueden ser componentes estructurales específicos o metabolitos microbianos. A continuación se reseñan, brevemente, algunas aplicaciones de herramientas cromatográficas al análisis tanto de constituyentes estructurales como de metabolitos microbianos.

Lípidos estructurales microbianos

Una comunidad microbiana se caracteriza por su estructura y su función. La *estructura* se define como la ordenación y distribución de los diferentes componentes de la comunidad microbiana, incluyendo el número de especies y su abundancia relativa, su distribución espacial y los componentes abióticos asociados a esta distribución. Y la *función* se entiende, en términos generales, como actividad microbiana. Las bacterias y los hongos son los grupos dominantes en la biomasa microbiana y su abundancia se puede estimar básicamente de tres formas: microscopía, inhibición selectiva y análisis de marcadores bioquímicos, que incluyen tanto componentes de las membranas como de las paredes celulares. Los componentes estructurales básicos de la célula bacteriana (procariontes) son la pared celular, la membrana plasmática, el ADN nuclear y los ribosomas. En las bacterias Gram positivo (G+) la membrana plasmática está rodeada por una gruesa pared celular que contiene ácidos teicoicos y peptidoglicano. Las bacterias Gram negativo (G-) tienen una pared mucho más delgada, que a su vez está rodeada por una membrana celular externa que es muy similar a la membrana plasmática. Las paredes celulares de las bacterias G- contienen peptidoglicano pero carecen de ácidos teicoicos. Los hongos (eucariotes) tienen también sus propios biomarcadores específicos que son parte de la membrana celular (**Figura 1**).

Así pues, el aislamiento directo de los componentes celulares de las comunidades microbianas completas representa un método importante para la evaluación cuantitativa de la abundancia microbiana y de la composición de dichas comunidades. En este contexto, el análisis de ácidos grasos celulares ha demostrado ser particularmente útil para la caracterización e identificación de diferentes grupos microbianos.

Perfiles de las comunidades microbianas vía análisis de ácidos grasos

Todas las membranas celulares contienen ácidos grasos (fatty acids, FAs), unidos generalmente al glicerol por un enlace de tipo éster constituyendo los fosfolípidos de

los ácidos grasos (phospholipid fatty acids, PLFAs); éstos se extraen y esterifican para formar metil ésteres de ácidos grasos (fatty acid methyl esters, FAMES). El perfil resultante del análisis de FAMES por GC-MS constituye una "huella dactilar" de los microorganismos presentes en una muestra, pues contiene algunos biomarcadores microbianos (Figura 1).

Para extraer FAs, al igual que para extraer cualquier otra clase de lípidos, la elección del procedimiento adecuado debe tener en cuenta, entre otras consideraciones, el origen animal, vegetal o microbiano de la muestra. Sin embargo, los ácidos grasos se extraen habitualmente con mezclas de disolventes orgánicos polares y no-polares. Cualquiera que sea el método de extracción elegido, el extracto obtenido se suele analizar por GC, razón por la cual los FAs polares han de ser transformados en sus derivados metilesterificados (FAMES) menos polares, habitualmente mediante una metanolisis alcalina suave (White and Ringelberg, 1998) o utilizando hidróxidos como el hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) (Gómez-Brandón et al., 2008).

Con la metodología que proponemos (Gómez-Brandón et al., 2008), basada en una extracción con el método clásico de Folch modificado y derivatización con TMSH, es posible determinar la cantidad total de PLFAs, la presencia de clases estructurales particulares (saturados, insaturados, *iso*, *anteiso*, ...) y también PLFAs individuales utilizados como biomarcadores de grupos microbianos específicos (G+, G- y hongos) (Figura 1). Ciertos PLFAs pueden utilizarse como biomarcadores para determinar no sólo la presencia sino la abundancia de grupos microbianos específicos (Zelles, 1997). Para representar los PLFAs¹ bacterianos se ha seleccionado la suma de i14:0, i15:0, a15:0, i16:0 y a17:0 para bacterias Gram+ y de 16:1w7c, 17:1w7c, 18:1w7c, cy17:0 y cy19:0 para bacterias Gram-; como biomarcadores fúngicos se han usado el 18:2w6c y el 18:1w9c. Es importante destacar que la mayoría de los PLFAs están presentes en un amplio rango taxonómico de microorganismos en concentraciones diferentes, por lo que no pueden utilizarse para cuantificar o determinar especies o géneros específicos en comunidades microbianas completas, pero sí para evaluar cambios en la abundancia relativa de grupos taxonómicos amplios como los que se han mencionado

(Bardgett, 2005). El análisis de la composición de PLFAs es una de las herramientas más comúnmente utilizadas, aparte de los cultivos en placa, para la investigación de poblaciones microbianas en estudios ecológicos (Øvreås, 2000). La mayor potencia de este enfoque basado en perfiles lipídicos, en comparación con otro tipo de análisis de la comunidad microbiana, es que los PLFAs se sintetizan rápidamente durante el crecimiento microbiano y también se degradan rápidamente después de la muerte microbiana y, además, no son moléculas de reserva energética, por lo que proporcionan una "huella dactilar" precisa y real de la comunidad viva en el momento del análisis (Evershed et al., 2006).

En el primer caso de estudio que se comenta, se ha utilizado la metodología analítica optimizada para estudiar las comunidades microbianas de matrices medioambientales sólidas con un alto contenido de materia orgánica mediante su composición en FAMES. Los datos obtenidos permiten establecer la importancia de los diferentes grupos de microorganismos en las diferentes matrices sólidas (Figura 2). En este caso, el análisis de los perfiles de PLFAs indica que la estructura de la comunidad microbiana difiere entre muestras de suelo, estiércol, compost y vermicompost. Además, tanto la biomasa microbiana viable (medida como contenido total en PLFAs) como la abundancia de bacterias y hongos son mucho mayores en las muestras de vermicompost que en las de compost y estiércoles iniciales.

También se analizaron los perfiles de FAMES para evaluar la diversidad y cantidad de ácidos grasos y comparar las distintas huellas biológicas. En las muestras analizadas, se identificaron y cuantificaron por GC-MS 21 PLFAs, de entre 10 y 18 átomos de carbono, saturados, mono- y poliinsaturados y ramificados y sus respuestas se procesaron mediante técnicas de análisis multivariante. Este enfoque resultó muy útil para comparar las comunidades microbianas en residuos animales no tratados y en los productos finales resultantes de los procesos de su degradación biológica (compost y vermicompost) (Gómez-Brandón et al., 2011; Lores et al., 2006).

Aunque la mayoría de los estudios sobre semioquímicos en invertebrados se han llevado a cabo en insectos, ya sea en relación con las feromonas sexuales o con el

¹ La nomenclatura propuesta por la IUPAC (1977) es A:B ω C. La letra A se refiere al número total de átomos de carbono, seguido por el número de dobles enlaces (B) y su posición (C), tomando como referencia el átomo de carbono ω . Los átomos de carbono de los ácidos grasos se numeran empezando por el extremo carboxilo. Los átomos 2 y 3 se denominan α y β respectivamente; y el átomo del grupo metilo al final de la cadena hidrocarbonada se conoce como ω . Las configuraciones *cis* y *trans* se representan con las letras *c* y *t* respectivamente. Los prefijos *i*, *a* y *10 Me* indican la existencia de un grupo metilo en posiciones *iso* (penúltimo carbono), *anteiso* (antepenúltimo carbono), y en el décimo carbono; y el prefijo *cy* simboliza a los ácidos grasos con un anillo interno de ciclopropano.

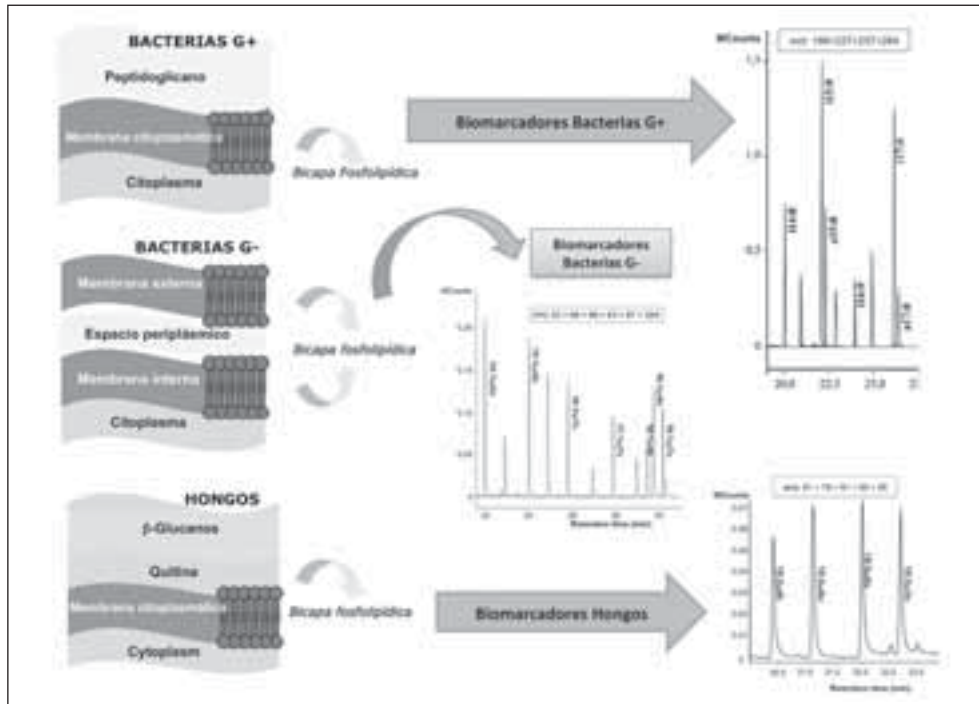


Figura 1. Esquema de las cubiertas celulares y biomarcadores de la fracción fosfolipídica de las membranas de varios grupos de Microbiota: cromatogramas de iones seleccionados para ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados, y saturados de cadena ramificada; representativos de hongos, bacterias Gram – y bacterias Gram +, respectivamente.

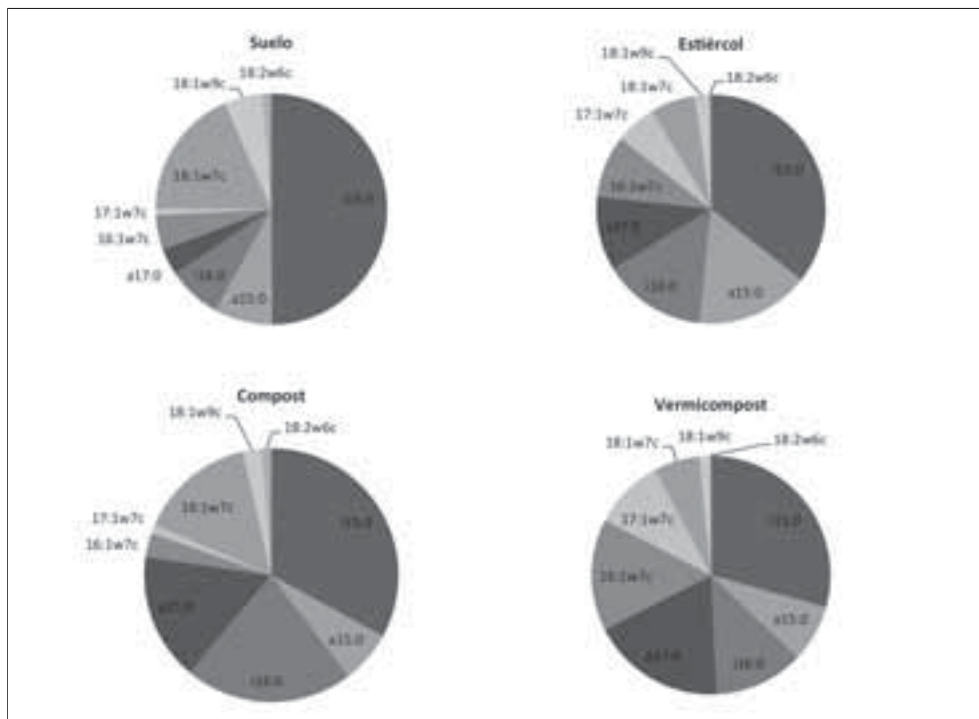


Figura 2. Abundancia de cada PLFA biomarcador ($\mu\text{g g}^{-1}$) de bacterias G+ (i14:0, i15:0, a15:0, i16:0 y a17:0), bacterias G- (16:1w7c, 17:1w7c, 18:1w7c) y hongos (18:2w6c, 18:1w9c) en las diferentes muestras sólidas estudiadas.

control de plagas (Grasswitz and James, 2009), la metodología analítica que se ha resumido previamente, puede utilizarse también para estudiar interacciones bióticas entre los microorganismos y un importante grupo de animales del suelo, las lombrices de tierra, tanto en estudios de ecología del suelo básicos como aplicados.

Los efectos de las lombrices de tierra sobre la comunidad microbiana varían dependiendo de la especie y de su dieta. El vermicompostaje, método muy eficaz para convertir los residuos sólidos orgánicos en biofertilizantes, es un proceso acelerado que implica la biooxidación y la estabilización del residuo, como resultado de las interacciones entre algunas especies de lombrices de tierra y los microorganismos. *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* y *Perionyx excavatus* son especies de lombrices de tierra muy utilizadas para procesar sustratos orgánicos en el vermicompostaje.

El análisis multivariante de 25 PLFAs (i14:0, 14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 16:0, 10Me16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me17:0, 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7, 18:0, 10Me18:0, cy19:0, 20:4 ω 6, 20:5 ω 3, 20:3 ω 6) diferencia claramente entre el vermicompost obtenido con las tres especies diferentes de lombrices de tierra, con independencia de si el estiércol utilizado para el vermicompostaje era de vaca, caballo o conejo (**Figura 3**). Esto indica que hay diferentes perfiles de PLFAs asociados con los vermicompost y no relacionados con el tipo de estiércol animal utilizado, sino más bien con las especies de lombrices de tierra y/o su microflora intestinal endosimbiótica (Gómez-Brandón et al., 2012). Por otra parte, la separación entre vermicompost y sustratos de control (estiércoles procesados sin lombrices) también fue muy clara (Figura 3), lo que indica que las lombrices de tierra desempeñan un papel clave en la configuración de la estructura de la comunidad microbiana en los residuos orgánicos durante el proceso de vermicompostaje. Se encontraron resultados similares analizando también los perfiles de FAMES (Lores et al., 2006) o la evolución de los PLFAs a través del proceso de vermicompostaje de bagazo de uva (Gómez-Brandón et al., 2010).

Metabolitos microbianos

Las bacterias producen un amplio rango de metabolitos secundarios que facilitan tanto la competición entre especies como la colonización de diversos nichos ecológicos (Ortori et al., 2011). Así, se ha demostrado la existencia de interacciones bioquímicas entre los microorganismos y su medio mediante a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles de origen microbiano

(MVOCs) (Davis et al., 2013). Además de para evaluar el contexto funcional y ecológico de las señales MVOC en la exploración de importantes rutas metabólicas implicadas en su producción, los MVOCs también se pueden utilizar para controlar la “invasión” microbiana de productos de consumo, como por ejemplo la contaminación microbiológica de alimentos (García-Cañas and Cifuentes, 2007) o de cosméticos (Álvarez-Rivera et al., 2013). Se ha intentado también establecer correlaciones entre los MVOCs y especímenes específicos, para determinar si algunos MVOCs podrían servir como marcadores para la detección de ciertas especies microbianas en particular.

La espectrometría de masas, incluyendo su integración con técnicas de separación como la cromatografía líquida, la cromatografía de gases y la electroforesis capilar, es una potente herramienta bioanalítica para estudios de metabolómica. En aquellas aplicaciones en las que se conocen los metabolitos de interés y existe disponibilidad de patrones puros, la cuantificación se puede llevar a cabo con un alto nivel de precisión, exactitud y sensibilidad; sin embargo, dichos metabolitos han de ser extraídos de las muestras de un modo robusto y cuantitativo (o, al menos, conocido) y, así, la etapa de tratamiento de muestra previa al análisis se convierte, como en tantos otros ámbitos, en un aspecto clave de este tipo de estudios (Dunn and Hankemeier, 2013).

La microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (Headspace Solid-Phase Microextraction, HSSPME) es una opción muy interesante, ya que integra las etapas de extracción, concentración e introducción de muestra en un único paso, reduciendo el tiempo de preparación de muestra e incrementando simultáneamente la sensibilidad en relación con otras técnicas de extracción. De hecho, el acoplamiento con cromatografía de gases-espectrometría de masas (HSSPME-GC/MS) se considera una interesante opción para el análisis de MVOCs (Zhang and Li, 2010).

Detección de contaminación microbiana en cosméticos mediante biomarcadores volátiles

En este contexto, se propone un método basado en MVOCs para la detección rápida de contaminación microbiana. Los resultados demuestran que es factible identificar microorganismos viables en cosméticos, cualitativamente, e incluso cepas microbianas específicas, mediante la detección de biomarcadores volátiles, lo que resulta un complemento muy valioso para otros métodos de detección rápida. En este tipo de aplicación hay que contemplar dos cuestiones preliminares importantes: la

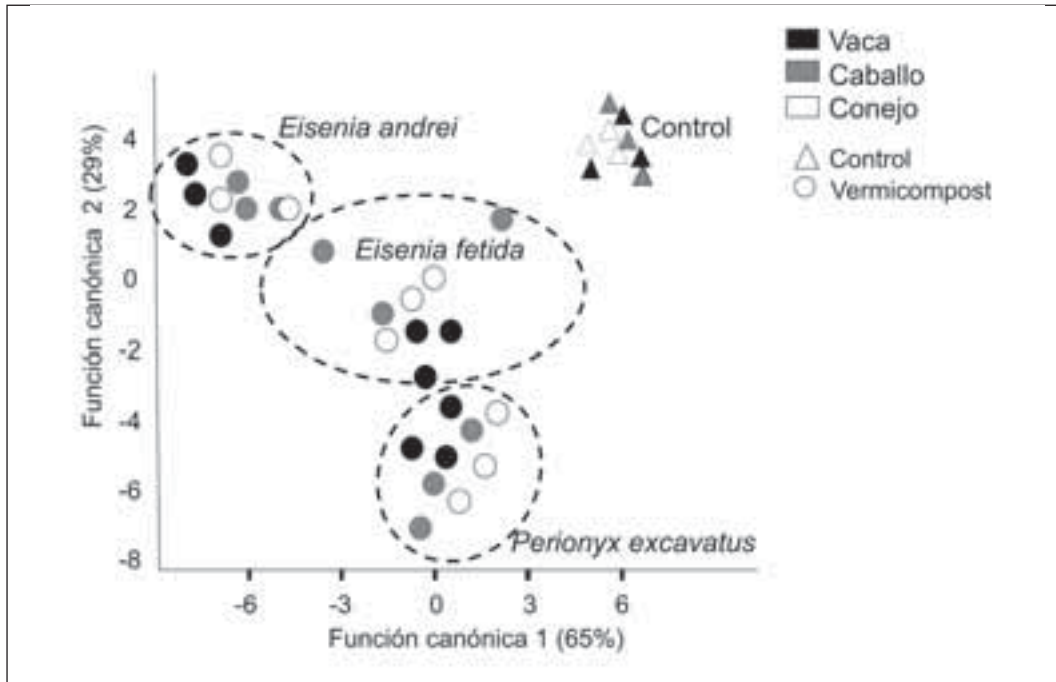


Figura 3. Diagrama de dispersión obtenido como resultado del Análisis Lineal Discriminante (LDA) ($Wilks\leftrightarrow 1 = 0,00099$, $p < 0,0001$) realizado para los PLFAs de los vermicompost producidos con las tres especies epigeas de lombriz (*Eisenia andrei*, *E. fetida* y *Perionyx excavatus*). Se observa la modificación específica de la composición de la comunidad microbiana de tres estiércoles animales diferentes (vaca, caballo y conejo –iniciales-) después de un mes de vermicompostaje con las tres especies distintas de lombriz de tierra. Cada control representa el mismo tratamiento, pero sin lombrices.

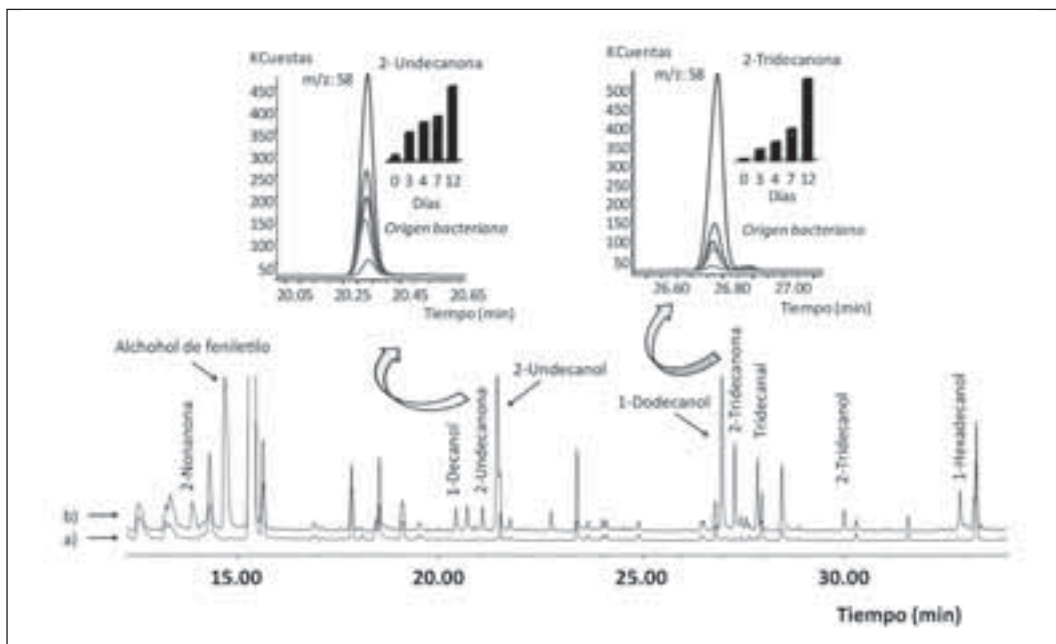


Figura 4. Cromatogramas de ion total (TIC) superpuestos de medio de cultivo TSB (a) y de medio de cultivo TSB incubado con *Pseudomonas fluorescens* (b). Perfiles cinéticos que muestran la producción de 2-undecanona y 2-tridecanona en una crema de manos incubada con *P. fluorescens*

identificación fiable de los diferentes MVOCs y el análisis de blancos. Para identificar de modo seguro los volátiles de origen microbiano estudiados, es muy recomendable el uso de herramientas complementarias a las bibliotecas de espectros de masas, como los índices de retención de Kovats -especialmente cuando no existen patrones adecuados-, que permiten distinguir compuestos relacionados tales como isómeros geométricos y posicionales, los cuales producen espectros de masas muy similares entre sí. Debe prestarse también una atención muy especial al análisis de blancos, tanto de los medios de cultivo como de las muestras cosméticas ensayadas, puesto que ambos son fuentes abundantes de compuestos volátiles en sí mismas. Esta complejidad en los perfiles cromatográficos se afronta fácilmente gracias a la selectividad del modo SIM (Selected-Ion Monitoring o Monitorización Selectiva de Iones) de la espectrometría de masas.

No es necesario que los cosméticos sean estériles pero deben estar adecuadamente conservados, o protegidos de algún modo, del deterioro y la contaminación microbiana. El simple uso normal y cotidiano de productos cosméticos ya los expone repetidamente a la acción de microorganismos en la saliva, las manos sucias, el agua de grifo, etc. (Sutton, 2006). La contaminación bacteriana más común en cosméticos incluye los géneros *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* y *Serratia spp.* entre otros (Geiss, 2006). Así, para llevar a cabo el análisis de los compuestos volátiles producidos por esta clase de bacterias en cosméticos, se han seleccionado miembros representativos de los géneros mencionados: *P. fluorescens*, *S. marcescens* y *K. pneumoniae*. *Escherichia coli* se incluyó también en el estudio debido a su presencia ubicua en entornos humanos.

Las bacterias seleccionadas se hicieron crecer en un medio de cultivo adecuado y los compuestos volátiles producidos metabólicamente se analizaron mediante HS-SPME-GC/MS (Alvarez-Rivera et al., 2013). Se detectaron varios MVOCs comunes, al menos, a tres de las bacterias estudiadas; concretamente las cetonas 2-nonanona, 2-undecanona, 2-tridecanona y 2-pentadecanona; y los alcoholes grasos 1-decanol, 1-dodecanol, 2-tridecanol y 1-pentadecanol, además del 2-feniletanol; si bien cada especie mostró un perfil particular y distintivo. La Figura 4 muestra la superposición de cromatogramas de ion total (TIC, Total Ion Chromatogram) del caldo de soja trípico (TSB, tryptic soy broth) que se ha utilizado como medio de crecimiento bacteriano (blanco) y del mismo medio TSB incubado con *P. fluorescens*. En el cromatograma del cultivo bacteriano, se identifican 10 compuestos claramente diferenciados del blanco y relacionados, por tanto, con el crecimiento de *Pseudomonas*. Pero además,

la combinación HSSPME-GC/MS permite el seguimiento del perfil cinético de algunas sustancias volátiles identificadas como potenciales biomarcadores de contaminación microbiana (Figura 4). Para evaluar en detalle el comportamiento cinético de los MVOCs identificados, se inoculó una crema de manos con *P. fluorescens* y se incubó durante períodos crecientes de tiempo hasta un total de 12 días. Como puede observarse, las respuestas obtenidas para la 2-undecanona y la 2-tridecanona mostraron un crecimiento significativo durante el periodo de incubación (especialmente pronunciado para la 2-tridecanona entre los días 7 y 12, lo que sugiere la tendencia exponencial típica de los metabolitos de crecimiento bacteriano). Aunque estrictamente, sólo los experimentos con nutrientes que contengan precursores marcados pueden demostrar de manera concluyente si un determinado compuesto es en realidad producido por una bacteria determinada, los datos confirmados en la bibliografía disponible y la evidencia cinética apoyan la hipótesis de que los compuestos volátiles identificados son biomarcadores de presencia bacteriana. Más aún, la cinética de consumo de algunos de los ingredientes cosméticos son prueba evidente de actividad metabólica bacteriana en sustratos cosméticos (Álvarez-Rivera et al., 2013), ya que muestran un comportamiento cinético completamente opuesto al de los metabolitos relacionados con el crecimiento bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal A.A., Petschenka G., Bingham R.A., Weber M.G., Rasmann S. (2012) Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions. *New Phytologist* 194:28-45.
- Álvarez-Rivera G., De Miguel T., Llompart M., Garcia-Jares C., Villa T.G., Lores M. (2013) A novel outlook on detecting microbial contamination in cosmetic products: analysis of biomarker volatile compounds by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods* 5:384-393.
- Bardgett R.D. (2005) *The biology of soil: a community and ecosystem approach* Oxford University Press.
- Davis T.S., Crippen T.L., Hofstetter R.W., Tomberlin J.K. (2013) Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 39:840-859.
- Dunn W.B., Hankemeier T. (2013) Mass spectrometry and metabolomics: past, present and future. *Metabolomics* 9:1-3.

- Eren A.M., Maignien L., Sul W.J., Murphy L.G., Grim S.L., Morrison H.G., Sogin M.L. (2013) Oligotyping: differentiating between closely related microbial taxa using 16S rRNA gene data. *Methods in Ecology and Evolution* 4:1111-1119.
- Evershed R.P., Crossman Z.M., Bull I.D., Mottram H., Dungait J.A., Maxfield P.J., Brennand E.L. (2006) 13 C- Labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 17:72-82.
- García-Cañas V., Cifuentes A. (2007) Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. *Electrophoresis* 28:4013-4030.
- Geiss P.A. (2006) *Cosmetic Microbiology, A Practical approach*, in: P. A. Geiss (Ed.), Taylor & Francis, New York. pp. 167.
- Gómez-Brandón M., Lores M., Domínguez J. (2008) Comparison of extraction and derivatization methods for fatty acid analysis in solid environmental matrixes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:505-514.
- Gómez-Brandón M., Lores M., Domínguez J. (2012) Species-specific effects of epigeic earthworms on microbial community structure during first stages of decomposition of organic matter, *PloS One* 7 (2): e31895.
- Gómez-Brandón M., Lazcano C., Lores M., Domínguez J. (2010) Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition. *Applied Soil Ecology* 44:237-244.
- Gómez-Brandón M., Aira M., Lores M., Domínguez J. (2011) Epigeic earthworms exert a bottleneck effect on microbial communities through gut associated processes, *PloS One* 6 (9): e24786.
- Grasswitz T., James D. (2009) Influence of hop yard ground flora on invertebrate pests of hops and their natural enemies. *Journal of Applied Entomology* 133:210-221.
- Jones G.R., Oldham N.J. (1999) Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* 843:199-236.
- Lores M., Gómez-Brandón M., Pérez-Díaz D., Domínguez J. (2006) Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2993-2996.
- Millar J.G. (2012) Role of Gas Chromatography in the identification of pheromones and related semiochemicals. En: C. Poole (Ed), *Gas Chromatography*, Elsevier, pp. 679-687.
- Mori K. (2013) *Chemical Ecology*. En: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, pp. 1-3.
- Ortori C.A., Dubern J.-F., Chhabra S.R., Cámara M., Hardie K., Williams P., Barrett D.A. (2011) Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4 (1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:839-850.
- Øvreås L. (2000) Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters* 3:236-251.
- Pickett J.A. (2006) Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. En: Dicke, M., Takken, W. (Eds.), *Chemical Ecology: from Gene to Ecosystem*, Springer, pp. 161-173.
- Romeo J.T. (2013) Preface: microbial chemical ecology. *Journal of chemical ecology* 39:807-808.
- Sutton S.V.W. (2006) *Cosmetic Microbiology, A Practical approach*, in: P. A. Geiss (Ed.), Taylor & Francis, New York. pp. 112.
- White D., Ringelberg D. (1998) Signature Lipid Biomarker Analysis'. In: Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., Saylor, G.(Eds.) *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford University Press, Inc., New York, pp. 255-272.
- Williams P., Winzer K., Chan W.C., Camara M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 362:1119-1134.
- Zelles L. (1997) Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35:275-294.
- Zhang Z., Li G. (2010) A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchemical Journal* 95:127-139.