

ESTUDIO DEL METABOLOMA EN EL ANTAGONISMO MICROBIANO A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ALGORITMOS QUIMIOMÉTRICOS

Metabolome analysis in the microbial antagonism by liquid chromatography coupled with chemometrics algorithms

¹B. Chalén-Alvarado[§], ²C. Quiroz-Moreno^{§*}, ²NGS. Mogollón, ¹C. Domínguez, ¹J. Rodríguez

¹Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM), Guayaquil, Ecuador.

²Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Napo, Ecuador.

*cristianquirozd1997@gmail.com

[§]Ambos autores contribuyeron de forma igualitaria para este artículo

Resumen

El metaboloma es el conjunto de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (metabolitos) producidos por sistemas biológicos. El antagonismo microbiano es una importante fuerza evolutiva, por lo que el análisis de su metaboloma es una herramienta útil para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica. El objetivo de este trabajo fue implementar el uso de algoritmos quimiométricos para la identificación de variaciones en el metaboloma del antagonismo microbiano entre *Pseudovibrio denitrificans* y *Vibrio harveyi*. Extractos de bacterias y del medio de cultivo usado fueron analizados por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (UHPLC-DAD). Además, algoritmos quimiométricos fueron aplicados realizando un Análisis de Componentes Principales (PCA) de los cromatogramas obtenidos. Se encontraron tres picos que expresaron una mayor variabilidad entre el metaboloma individual y el metaboloma de la interacción de *P. denitrificans* y *V. harveyi*. De esta manera, la metabolómica con UHPLC-DAD y algoritmos quimiométricos demostró ser una herramienta útil para la identificación de picos responsables de las diferencias entre interacciones microbianas.

Palabras Claves: Antagonismo microbiano, cromatografía líquida, análisis de componentes principales, *Pseudovibrio denitrificans*, *Vibrio harveyi*.

Abstract

Metabolome is a group of low molecular weight organic compounds (metabolites) produced by biological systems. Bacterial antagonism is an important evolving force, in this sense analysis of its metabolome represents a useful tool for discovering new molecules with biological activity. The objective of this research work was to implement the use of chemometric algorithms for the identification of variations in the metabolome of the microbial antagonism between *Pseudovibrio denitrificans* and *Vibrio harveyi*. Extracts from cultured bacteria and used culture media were analyzed by Ultra-high performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector (UHPLC-DAD). Additionally, chemometric algorithms were employed, subjecting to Principal Component Analysis (PCA) for the obtained chromatograms. Three peaks were found that express the major variability between the individual metabolome and the metabolome from the interaction of *P. denitrificans* and *V. harveyi*. In this manner, metabolomic through UHPLC-DAD and chemometric algorithms, showed to be a useful tool to identify the peaks responsible for differences between microbial interactions.

Keywords: Microbial antagonism, liquid chromatography, principal component analysis, *Pseudovibrio denitrificans*, *Vibrio harveyi*.

Fecha de recepción: 30-08-2018

Fecha de aceptación: 17-06-2019

I. INTRODUCCIÓN

El antagonismo es un tipo de interacción entre especies en la cual dos o más individuos tienen una posición de hostilidad o competencia, ya sea por recursos, territorio o reproducción. Esta presión por competición es una de las mejores fuerzas evolutivas en microbiomas, donde una especie debe asegurar su supervivencia sobre la enorme diversidad de microorganismos que la acompañan (1). En el ámbito marino, encontramos que las interacciones de bacterias asociadas con arrecifes de coral intervienen en el mantenimiento de la salud de este bioma. Entre el amplio espectro de bacterias asociadas a biomas de arrecifes se encuentran los géneros *Pseudovibrio* y *Vibrio*, los cuales comparten hábitat y presentan altos índices de antagonismo entre ellos (2). Estudios basados en el antagonismo microbiano se han usado para desarrollar biocontroles contra microorganismos perjudiciales en diversos campos (3–6). La expresión de compuestos activos presentes en los microbiomas que intervienen en la competición presentan una oportunidad para el aislamiento de moléculas bioactivas, siendo una estrategia prometedora para el descubrimiento de especies químicas para el control de agentes patógenos. Trabajos previos indican la habilidad antagónica de *Pseudovibrio denitrificans* contra *Vibrios* patógenos (7) lo que los convierte en una herramienta útil contra vibriosis. A pesar de que se han identificado compuestos antimicrobianos en cepas de *Pseudovibrios* como el ácido tropoditiético (TDA) (8) se desconoce la naturaleza de este antagonismo.

Entre las técnicas que se emplean para el estudio de sistemas biológicos, se encuentra la metabolómica. Existen dos tipos de estudio en metabolómica: (a) direccionados y (b) no direccionados, la diferencia de estos radica en que en metabolómica direccionada se realiza el análisis de un grupo pequeño de metabolitos, mientras en la metabolómica no direccionada se analiza el metaboloma completo (9). Se define como metabolito a cualquier molécula de bajo peso molecular que

es encontrada en un sistema biológico (10). Uno de los enfoques de la metabolómica nos permite comprender los cambios que suceden en el metaboloma de un sistema biológico como consecuencia de estímulos específicos (11). Como ejemplo tenemos el estudio de las interacciones de antagonismo, modificaciones genéticas, estímulo fisiológico, entre otros (12).

Para el estudio del metaboloma la cromatografía líquida (LC) es la opción preferencial ya que más del 90% de los metabolitos son polares y no volátiles (13). Los sistemas de detección acoplados a los cromatógrafos se pueden basar en la medición de la capacidad de una molécula para absorber energía lumínica (espectrofotometría) o en la medición de la relación de su masa/carga luego de ser ionizado (espectrometría). Entre los detectores espectrofotométricos encontramos el de arreglo de diodos (DAD). El conjunto de señales que llegan al DAD conforman picos y el conjunto de picos es conocido como cromatograma. La quimiometría se encarga del análisis, interpretación y visualización de datos de origen químico. Con un alto número de cromatogramas obtenidos, la comparación y discriminación de picos de interés demandarían gran cantidad de tiempo, además de tener un grado de subjetividad dependiente de la persona que realiza esta tarea (14).

El uso de algoritmos no supervisados que puedan manejar un gran número de variables y de muestras al mismo tiempo han ayudado a solucionar los cuellos de botella en el manejo de grandes cantidades de datos, ya que existe un análisis numérico de todas las variables presentes (15). De esta manera, las señales obtenidas por LC-DAD pueden ser sometidas a un pre-procesamiento para la corrección de ruido químico, seguido de un análisis discriminante entre muestras y/o grupos, como es el Análisis de Componentes Principales (PCA), Cuadrados Mínimos Parciales Discriminantes (PLS-DA), entre otros (16).

El objetivo de este trabajo fue implementar el uso de algoritmos quimiométricos para la identificación de variaciones en el metaboloma del antagonismo microbiano entre *Pseudovibrio denitrificans* y *Vibrio harveyi*. Estas variaciones pueden ser usadas como herramienta para la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana. Este trabajo representa un estudio preliminar cuyos resultados nos guiarán a la purificación y elucidación estructural de metabolitos con posible actividad antimicrobiana.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción del antagonismo

La cepa de *P. denitrificans* fue obtenida de muestras de invertebrados marinos sésiles, colectados en la Reserva Ma-

rina El Pelado, provincia de Santa Elena, Ecuador (-1,93514 S, -80,79939 O) en el extremo sur del Pacífico este tropical. La cepa empleada de *V. harveyi*, fue tomada del cepario del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

Para inducir el efecto antagonista entre los microorganismos, el cultivo de *V. harveyi* fue ajustado por densidad óptica a 620 nm hasta una absorbancia de 0.6; equivalente a 1×10^8 células por mL^{-1} . Se usó una solución de cloruro de sodio al 2% (J.T. Baker, Estados Unidos) para hacer la suspensión de bacterias. De esta suspensión bacteriana 200 μl fueron inoculados por extensión en placas Petri que contenían agar marino (Difco, Estados Unidos). La cepa de *P. denitrificans* fue cultivada por 48h en placas de agar marino y recogida en forma de cúmulo con ayuda de un asa.

Se inoculó el cúmulo formado de *P. denitrificans* como un punto (de diámetro ~ 2 -3 mm) en la superficie de la placa de agar marino en la que previamente fue extendida la suspensión de *V. harveyi* para obtener el tratamiento de antagonismo. Las placas con el inóculo y el cúmulo fueron incubadas a 28 °C durante 72 horas en una incubadora (Heratherm® IGS 180, Thermo Scientific, Alemania). Como controles se cultivaron *V. harveyi* y *P. denitrificans* en placas separadas. Se incluyeron placas con medio de cultivo sin inocular como control negativo (blanco).

Preparación de la muestra para cromatografía líquida

Se recuperaron tanto las colonias bacterianas (suspensión de bacterias) como el medio de cultivo utilizado. Las colonias fueron suspendidas en agua grado I y transferidas a embudos de separación. El medio de cultivo fue cortado en trozos de aproximadamente 1 cm^3 para luego ser transferidos a frascos con tapa rosca, los controles de bacterias cultivadas por separado y el medio de cultivo sin inocular recibieron el mismo tratamiento. Ambos tipos de muestra fueron sometidas a extracción con una parte de acetato de etilo grado analítico (J.T. BAKER, Estados Unidos) por cada parte de muestra. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó el solvente en rotavapor (Buchi, RII, Suiza). Los residuos secos tanto de la muestra de suspensión de bacterias y de agar fueron sometidos a Extracción en Fase Sólida (SPE por sus siglas en inglés) con cartuchos SPE C18 (Thermo Scientific, HYPERSEC, Estados Unidos), utilizando cinco diferentes eluyentes, 10 mL por cada uno: H_2O (F1), $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:1 (F2), MeOH (F3) (J.T. Baker, Trinidad y Tobago), $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1 (F4), y CH_2Cl_2 (F5) (SupraSolv®, Merck, Alemania). La primera y quinta fracción fueron almacenadas, las fracciones restan-

tes fueron evaporadas hasta sequedad.

Se recuperaron los residuos de SPE con el mismo solvente usado en la elución para cada fracción, se filtraron a través de filtros de 0.22 μm y se inyectaron en el cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia con detector de arreglo de diodos y detector evaporativo de dispersión de luz (UPLC-DAD-ELSD) (Waters, H-CLASS 1, Singapur). Las corridas cromatográficas fueron ejecutadas con una columna de fase reversa (C_{18}) de dimensiones 50 x 2.1 mm y de 1,7 μm de tamaño de partícula (ACQUITY, Waters, Irlanda). La fase móvil estuvo constituida por acetonitrilo (Sigma-Aldrich, Corea del Sur) y agua grado I, acidificados con 0.1% de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, Francia). Se realizó un gradiente de agua (A) y acetonitrilo (B) de 0-2 minutos 10% B, de 2-10 minutos B aumentó al 100%, de 10-12 minutos B se mantuvo y finalmente de 12-15 minutos B bajó al 10%. La absorbancia se registró a 254 nm.

Análisis de datos

Se tuvo un total de cuatro tratamientos (*P. denitrificans*, *V. harveyi*, antagonismo y blanco), con dos niveles (agar y suspensión de bacterias) con tres repeticiones cada uno, de las que se analizaron las fracciones F2, F3 y F4 por cada réplica, teniendo 72 cromatogramas como total. Los cromatogramas fueron exportados con el software Empower (Waters, versión 3.3, Massachusetts), e importados en el lenguaje estadístico R versión 3.4 para análisis posteriores. Todos los cromatogramas fueron recortados en los primeros 4 minutos. Después, se corrigió la línea de base y se procedió con el alineamiento de picos (17). Los datos fueron sometidos a un escalamiento y centrados en la media, como pretratamiento antes de realizar el PCA.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se pueden observar los cro-

matogramas de la fracción F3 del agar (Fig. 1A) y de la suspensión de bacterias (Fig. 1B) de las muestras en las que se indujo el antagonismo entre *P. denitrificans* y *V. harveyi*. El análisis de reconocimiento de patrones fue empleado para encontrar las diferencias entre las cepas cultivadas individualmente, el antagonismo entre ellas y el blanco de agar (no inoculado). Una vez corregida la línea base, se procedió con el PCA con datos centrados en la media, y escalados. El centrar en media corrige las señales producidas por artefactos químicos, como impurezas o cambios bruscos de fase móvil. Mientras que el escalado promueve que todas las variables tengan un mismo factor de importancia.

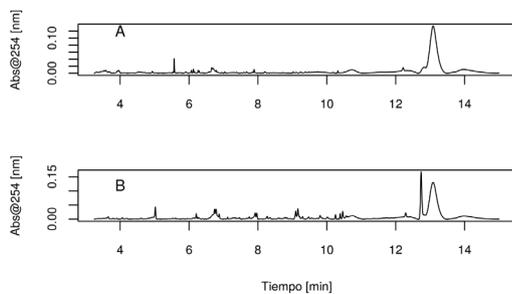


Figura 1. Cromatogramas representativos del antagonismo entre *Pseudovibrio denitrificans* y *Vibrio harveyi*. A es el cromatograma de la fracción F3 del agar y B es el cromatograma de la fracción F3 de la suspensión de bacterias. La cromatografía fue realizada en fase reversa con gradiente, una columna C18 y la absorbancia fue medida a 254 nm con un detector de arreglo de diodos (DAD).

En la figura 2 se pueden observar los resultados del PCA, tanto para los cromatogramas del agar (Fig. 2A) como los cromatogramas de las suspensiones de bacterias (Fig. 2B).

Mediante la comparación de la dispersión de los cromatogramas en el espacio proyectado en los dos primeros Componentes Principales (PC), se puede observar que las muestras de agar (Fig. 2A) tienen una mejor separación entre grupos de fracciones recolectadas por SPE en comparación con la misma proyección para las muestras de colonias (Fig. 2B). Esta mejor separación en grupos para las muestras de agar indica una mayor diversidad de compuestos presentes en el medio de cultivo en comparación con los compuestos presentes en las

muestras de bacterias.

Análogamente, se cree que acciones de competencia y/o antagonismo por sustrato en organismos de ambientes acuáticos están relacionados con la secreción de compuestos de carácter hostil que se difunden en el medio, ayudando a la competencia con otros individuos (18).

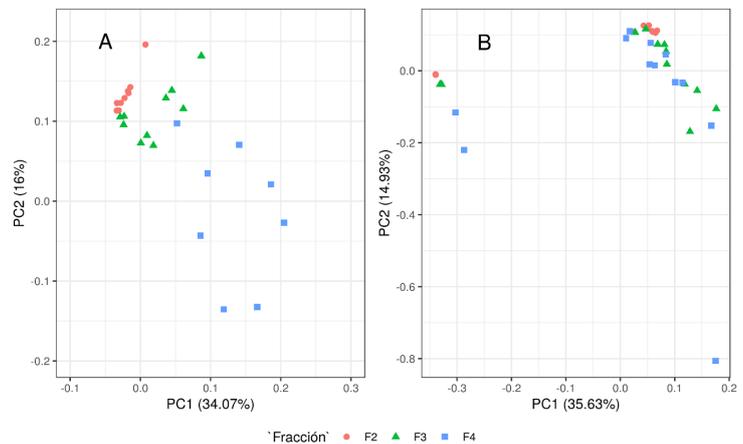


Figura 2. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los cromatogramas de las fracciones F2, F3 y F4 del agar (A) usado en el cultivo de las bacterias y de la suspensión de bacterias (B) recuperadas luego del cultivo. Todos los cromatogramas fueron centrados en media y escalados, con $n = 36$ para el agar y $n = 36$ para la suspensión de bacterias.

Los cromatogramas de las fracciones F2 y F4 del medio de cultivo presentan solapamiento y esparcimiento severo, respectivamente (Fig. 2A); por lo que fueron descartados para los análisis discriminantes posteriores para encontrar grupos dentro de las fracciones. Por lo tanto, se realizó el PCA solo para los picos de los cromatogramas de F3 de las muestras de agar para los distintos tratamientos.

En la figura 3 se presentan los scores del análisis de los tratamientos *P. denitrificans* (P.d.), *V. harveyi* (V.h.), Antagonismo (Ant.) y Blanco (Fig. 3A), y también se presentan los loadings (Fig. 3B). Por un lado, podemos analizar la dispersión de los cromatogramas para encontrar similitudes entre ellos (Fig. 3A).

Existe una estrecha relación entre los cromatogramas de antagonismo con los de *P. denitrificans*, por lo que se asume que el metaboloma de estos dos grupos están más relacionado entre sí, y son diferentes con el blanco y *V. harveyi*. Además el blanco y *V. harveyi* son diferentes entre sí, a pesar de que una de las tres réplica del blanco se encuentra cercana a *V. harveyi*, esto podría deberse a un artefacto en el procesamiento de las muestras.

En otras palabras, los tratamientos *P. denitrificans* y antagonismo presentan más compuestos similares entre si en algún

punto del cromatograma. Adicionalmente, con el objetivo de encontrar los compuestos responsables de la clasificación de las muestras, se analizaron los loadings negativos (Fig. 3B) de los dos primeros PCs, encontrando que en ambos componentes, entre el minuto 10 y 11 se encuentran compuestos que producen separación entre las muestras.

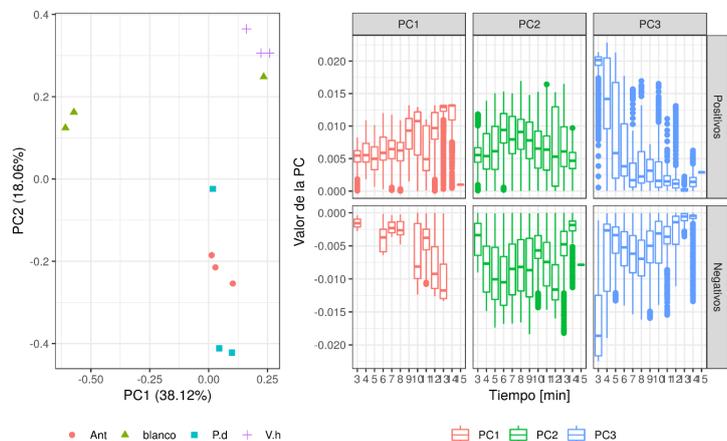


Figura 3. PCA de los cromatogramas de la fracción F3 del agar. En A se presentan los scores del análisis de los tratamientos *P. denitrificans* (P.d.), *V. harveyi* (V.h.), Antagonismo (Ant.) y Blanco. En B se presentan los loadings negativos de los dos primeros Componentes Principales (PCs) con $n = 12$. Entre los dos primeros componentes se expresa un total de 56.18% de la varianza de los datos. Por la disposición de los cromatogramas en A, se puede inferir que el perfil metabólico del antagonismo es más parecido al perfil de *P. denitrificans*. Además, en B es apreciable que el minuto 10 alberga los picos de mayor importancia discriminante.

Se realizó una inspección supervisada de todos los cromatogramas basados en los menores loadings obtenidos (Fig. 4). En base a la figura 3B se establece que en el minuto 10 existen compuestos cuya intensidad y/o presencia cambia entre tratamientos. Los tres compuestos más variables se muestran en la Figura 4 (A, B y C).

El compuesto A (Fig. 4) cambia levemente su tiempo de retención entre tratamientos. El compuesto B tiene la misma intensidad para *V. harveyi* y antagonismo, sin embargo, la intensidad para *P. denitrificans* es el doble, por lo que la interacción de antagonismo suprime la producción de este compuesto en las cepas de *P. denitrificans* pero no en *V. harveyi*. Adicionalmente, el pico C es producido únicamente en *P. denitrificans*, y su ausencia en el tratamiento de antagonismo sugiere que dicho compuesto ha sido metabolizado durante la interacción bacteriana. En otras palabras, es probable que el pico C sea un compuesto que pertenezca al armamento químico de *P. denitrificans* contra su antagonista. Una confirmación estructural de las moléculas de interés representadas por los picos A, B y C debe hacerse con el uso de herramientas de mayor poder analítico tales como espectrometría de masas, espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

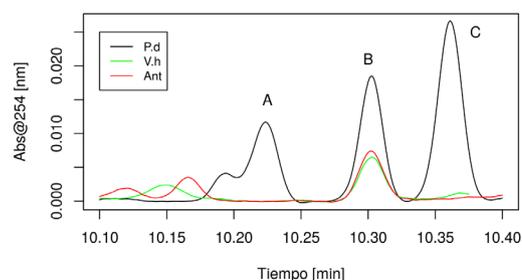


Figura 4. Inspección de cromatogramas representativos en el minuto 10. Se aprecian diferencias entre tres picos: A, B y C. El pico A está presente en *P. denitrificans* y en el Antagonismo (con un leve cambio en el tiempo de retención). El pico B, presenta la misma intensidad para *V. harveyi* y el Antagonismo, pero tiene el doble de intensidad para *P. denitrificans* por lo que se presume que la interacción entre estas cepas induce la supresión del pico B en *P. denitrificans*. El pico C es observado únicamente en *P. denitrificans* sugiriendo que este compuesto puede intervenir en la interacción con *V. harveyi*.

IV. CONCLUSIONES

Este trabajo presenta la aplicación de algoritmos quimiométricos en conjunto con la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos para el entendimiento del antagonismo microbiano entre *P. denitrificans* y *V. harveyi*. Con un análisis no supervisado como el PCA se estableció el tipo de matriz con mayor variabilidad de metabolitos entre tratamientos, siendo el medio de cultivo.

Adicionalmente, el PCA de los cromatogramas de la fracción F3 del medio de cultivo determinó similitudes entre los tratamientos de antagonismo y *P. denitrificans*, así como también determinó diferencias del blanco con los demás tratamientos. Mediante el análisis de loadings se identificó tres entidades químicas de importancia en esta relación de similitudes y diferencias de la fracción F3 del agar.

La inspección supervisada de las tres entidades químicas identificadas nos sugiere su participación en el antagonismo, reduciendo significativamente el rango de búsqueda para análisis posteriores que determinarán la estructura molecular de estas entidades.

De esta manera, el uso de la cromatografía líquida de ultra alta eficiencia junto con algoritmos quimiométricos demostró ser una herramienta útil para el análisis y entendimiento del metaboloma presente en el antagonismo de *P. denitrificans* y *V. harveyi* facilitando el tratamiento de una gran cantidad de datos y

reduciendo el tiempo necesario para análisis posteriores.

V. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e

Innovación (SENESCYT) en el marco del proyecto "Caracterización de la biodiversidad microbiológica y de invertebrados de la reserva marina El Pelado a escalas taxonómica, metabolómica y metagenómica, para uso en salud humana y animal" con permiso de investigación 005-17 IC-FAU-DPSE/MA y contrato de acceso a recurso genético MAE-DNB-CM-2015-0021.

Referencias

1. Burgess JG, Jordan EM, Bregu M, Mearns-Spragg A, Boyd KG. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology* 70(1-3):27-32. [*Archidoris pseudoargus* p. 30. *J Biotechnol* 70. 1999;70:27-32.
2. Rypien KL, Ward JR, Azam F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. *Environ Microbiol.* 2010;12(1):28-39.
3. You THC, Feng LZC, Kong JWF. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *BioControl.* 2015;
4. Spadaro D, Droby S. Trends in Food Science & Technology Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit : The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2016;47:39-49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
5. Palazzini J, Roncallo P, Cantoro R, Yerkovich N, Echenique V, Torres A, et al. Reduction of Deoxynivalenol Accumulation and Phytohormone Induction by Two Selected Antagonists. *Toxins (Basel).* 2018;10(88).
6. Khabbaz SE, Zhang L, Cáceres LA, Sumarah M, Wang A, Abbasi PA. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. *Ann Appl Biol.* 2015;166(3):1-16.
7. Raina J-B, Tapiolas D, Motti CA, Foret S, Seemann T, Tebben J, et al. Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. *PeerJ.* 2016;4:e2275.
8. Penesyán A, Tebben J, Lee M, Thomas T, Kjelleberg S, Harder T, et al. Identification of the Antibacterial Compound Produced by the Marine Epiphytic Bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and Related Sponge-Associated Bacteria. *Mar Drugs.* 2011 Aug;9(8):1391-402.
9. Murray JA. Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2012;1261:58-68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.012>
10. Patti G, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;5(SUPPL. 2):45-8.
11. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics-A review in human disease diagnosis. *Anal Chim Acta.* 2010;659(1-2):23-33.
12. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* [Internet]. 2002;48(1-2):155-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860207>
13. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2012;711:7-16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.042>
14. Fraga CG, Prazen BJ, Synovec RE. Objective data alignment and chemometric analysis of comprehensive two-dimensional separations with run-to-run peak shifting on both dimensions. *Anal Chem.* 2001;73(24):5833-40.
15. Szymańska E. Modern data science for analytical chemical data – A comprehensive review. *Anal Chim Acta.* 2018;1028.
16. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical Methods for the Analysis of High-Throughput Metabolomics Data. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2013;4(5):e201301009. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037014600520>
17. Wehrens R, Bloemberg TG, Eilers PHC. Fast parametric time warping of peak lists. *Bioinformatics.* 2015;31(18):3063-5.
18. Mille-Lindblom C, Fischer H, Tranvik LJ. Antagonism between bacteria and fungi: Substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos.* 2006;113(2):233-42.