

# ANÁLISIS FUNCIONAL DE MICROORGANISMOS: UN ESTIMADOR DE DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA COMUNITARIA

*Alejandra Zamora, Nora Malaver y Jesús Ramos<sup>†</sup>*

Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Zoología y Ecología Tropical,  
Universidad Central de Venezuela. Apartado postal 47058 Caracas 1041.  
nora.malaver@ciens.ucv.ve

## RESUMEN

Considerando que la diversidad microbiana es afectada por cambios del ambiente y que los patrones temporales de diversidad pueden ser sensibles indicadores del funcionamiento del ecosistema y a la vez herramientas útiles en la evaluación de ecosistemas perturbados o contaminados, en este trabajo se contextualizan los fundamentos teóricos del análisis funcional de las comunidades microbianas. Este análisis permite reducir el espacio real de las intrincadas relaciones microbianas a un espacio menos complejo y facilita la interpretación de datos microbiológicos. Se reseñan las principales metodologías del análisis funcional de microorganismos, basadas en la caracterización del perfil metabólico de la comunidad microbiana y el manejo estadístico de los datos para la delimitación de grupos funcionales microbianos, lo cual permite evaluar su estructura y diversidad funcional. Se incluyen experiencias de aplicación de esta herramienta en diferentes ámbitos de investigación de ecología microbiana en Venezuela. Finalmente, se concluye que el análisis funcional constituye una herramienta ventajosa en ecología, que permite a) determinar cambios espacio-temporales que ocurren en las comunidades microbianas, b) vincular los procesos del ecosistema y los microorganismos activos en los mismos y c) abrir una ventana al conocimiento del funcionamiento del ecosistema que permita formular estrategias de manejo sustentables.

**Palabras clave:** Comunidad Microbiana, Análisis Funcional, Grupos Funcionales, Índice de Diversidad Funcional, Ecología microbiana.

## Microbial Functional Analysis: A estimator of community structure and diversity

### Abstract

Considering that microbial diversity is affected by changes in the environment and that temporal patterns of diversity can be sensitive indicators of ecosystem functioning, as well as a tool for assessing disturbed or contaminated ecosystems, in this paper we undertake a theoretical contextualization of functional analysis of microbial communities. This analysis reduces the real space of intricate microbial relationships to a less complex space, thus making it easier to interpret

microbiological data. An overview of the main methodologies used for analyzing microorganisms is provided based on the characterization of the metabolic profile of the microbial community and the statistical assessment of the data that is used for delimitating microbial functional groups, thus allowing for the evaluation of the microbial community structure and functional diversity. Experiences regarding the application of this tool in different areas of microbial ecology research in Venezuela are included. Finally, we conclude that functional analysis in ecology is a tool that enables us to a) determine the spatiotemporal changes in microbial communities, b) link ecosystem processes with the microorganisms active in said ecosystems and c) open a window to the understanding of ecosystem functioning, which will improve the formulation of sustainable management strategies.

**Keywords:** Microbial Community, Functional Analysis, Functional Groups, Functional Diversity Index, Microbial Ecology.

## INTRODUCCIÓN

La *comunidad microbiana* es definida por Atlas y Bartha (2002) como un ensamblaje de poblaciones de microorganismos que interactúan entre ellas y con el ambiente, espacial y temporalmente. Dichas interacciones dependen de las poblaciones que la conforman y la distribución de las mismas en el espacio, confiriéndole a la comunidad atributos mediante los cuales es caracterizada: estructura y función (Begon *y col.*, 2006). La estructura de la comunidad puede ser medida y descrita en términos de composición de especies (diversidad), las cuales cumplen con funciones especializadas dentro del ecosistema (Atlas y Bartha, 2002).

Cuando se pretende realizar un análisis microbiano a nivel de comunidad, surge un problema al intentar determinar la estructura de la misma, debido a que esto implica la identificación taxonómica de sus integrantes, lo cual involucra un gran número de pruebas, tanto bioquímicas como fisiológicas que toman un tiempo considerable. Este tiempo puede ser tan largo que sobrepase la duración del estudio, o al menos, el tiempo en el cual pueda dar una respuesta a un problema determinado (Ramos, 1996).

Por otra parte, la identificación a nivel de especie no siempre garantiza que una determinada propiedad, por ejemplo, la degradación de un sustrato, sea característica de la especie y no de una cepa en particular (Ramos, 1996). A este respecto suele

encontrarse en la literatura que el reporte taxonómico genérico o específico es acompañado del código de la cepa en cuestión (Omori *y col.*, 1992; Köhler *y col.*, 1994). Asimismo, aunque entre otros factores la estructura comunitaria es importante, su determinación a altos niveles de precisión en un estudio particular puede ser superflua o inalcanzable dentro de los objetivos del mismo (Ramos, 1996). Por tanto, el análisis funcional de comunidades microbianas surge no solo como una alternativa viable, sino también poderosa, pues involucra el otro atributo comunitario: la función.

La estructura funcional de la comunidad se puede considerar como una alternativa para la estimación de la diversidad, debido a que además de apoyar el desarrollo de la identificación taxonómica, se basa en las características metabólicas de los microorganismos y, por tanto, constituye una herramienta útil, pues, es consecuencia de la diversidad genética taxo-específica, de los efectos ambientales sobre la expresión genética y de las interacciones ecológicas con otros taxa (Zak *y col.*, 1994).

En los últimos años se ha utilizado en ecología microbiana el análisis funcional como indicador de la diversidad y estructura de las comunidades microbianas, a través del uso de diferentes fuentes de carbono estableciendo así el perfil metabólico de los microorganismos y su comportamiento (Garland y Mills, 1991; Zak *y col.*, 1994; Grayston y Campbell, 1996; Malaver y Ramos, 1997; Griffiths *y col.*, 1997; Bending *y col.*, 2004; García *y col.*, 2004; Hernández *y col.*, 2006; Zamora *y col.*, 2012a; Fraç *y col.*, 2012).

Según Childress y Sharpe (1992) para abordar los estudios de a ecología poblaciones y comunidades microbianas, se requiere conocer cómo el genoma de las células bacterianas cambia en el tiempo (diversidad genética), mientras que, al mismo tiempo estos organismos responden a las condiciones ambientales. En este sentido, Zak *y col.*, (1994) y Trevors (1998) consideran que la diversidad de la comunidad microbiana podría ser interpretada desde tres enfoques: la diversidad taxonómica, la diversidad genética y la diversidad funcional.

La diversidad taxonómica se refiere a la riqueza o número total de especies de microorganismos que se encuentran en un lugar

determinado (Alexander, 1997). Este enfoque es poco utilizado debido a las dificultades existentes en la identificación de los microorganismos a nivel de especie, más bien está basado en relaciones filogenéticas y evolutivas de los microorganismos.

El segundo enfoque es la diversidad genética, que se refiere al conjunto total de genes presentes en los microorganismos de un lugar determinado que expresan un potencial de las capacidades metabólicas de ese ambiente; puede estimarse según el número de genomas distintos en un ambiente. Los estudios en diversidad genética han permitido obtener información sobre la composición y estructura de poblaciones y comunidades microbianas, establecer el impacto de los factores ambientales sobre la diversidad microbiana, y diseñar marcadores para el diagnóstico e identificación de bacterias cultivables y no cultivables (Torsvik y Øvreås, 2002; Nichols, 2007).

Finalmente, la diversidad funcional comprende el conjunto de capacidades metabólicas presentes en un ambiente (Trevors, 1998); esta es una información que no repara en taxa y no requiere de conocimientos detallados acerca de la identidad de los microorganismos involucrados, pero expresa su actividad fisiológica dentro del ecosistema. Tilman (2001) plantea que se puede generalizar la diversidad funcional como el conjunto de características de los organismos que influyen en las propiedades del ecosistema. Esta definición sugiere que un ecosistema con una alta diversidad funcional opera más eficientemente en términos de productividad, resiliencia y resistencia (Ricotta, 2005; Tilman *y col.*, 1997).

El planteamiento alude al concepto de resiliencia, la cual se considera como el indicador más general del funcionamiento del ecosistema, y se refiere a la capacidad de una comunidad para resistir o recuperarse ante una perturbación (Griffiths *y col.*, 1997). De manera que si ocurre una perturbación en la cual la diversidad disminuye, pero el sistema mantiene un rango de funciones claves, entonces el sistema es resiliente; y el tiempo que tarda la comunidad en recuperarse de dicha perturbación hasta una condición similar a la que se encontraba antes de la perturbación, es una medida de resiliencia (Griffiths *y col.*, 1997). Esto podría indicar que si una comunidad tiene suficiente diversidad de especies, pudiese perder algunas de ellas durante

una perturbación, y sin embargo, no se afectaría significativamente el funcionamiento, entonces el nivel de resiliencia es alto y el funcionamiento del ecosistema no será afectado a largo plazo (Ricotta, 2005).

Sin embargo, la relación existente entre diversidad genética (taxonómica) y la diversidad funcional es muy compleja. Los estudios realizados en este respecto sugieren que puede haber un nivel crítico de riqueza de especies por debajo del cual el funcionamiento del ecosistema se ve afectado negativamente (Griffiths *y col.*, 1997). No obstante, ésto está lejos de poder definir y caracterizar cuál es ese nivel, y debido a las complejas interacciones que ocurren, es poco probable que algún marco teórico o conceptual pueda relacionar de forma simple y directa la diversidad genética (taxonómica) con funciones específicas del ecosistema (Zak *y col.*, 1994; Emmerson *y col.*, 2001). Adicionalmente, la necesidad de estudiar la diversidad funcional de los microorganismos en su totalidad y no de forma individual, permite enfatizar en el sinergismo de las especies; es decir, cuando dos o más especies conducen a la transformación que una sola no puede llevarla a cabo o cuyo proceso al conducirse por diferentes especies interactuando es más rápido que la suma de los índices de las reacciones efectuadas por separado (Laine *y col.*, 1997).

En función de lo antes expuesto, en este trabajo se contextualizan fundamentos teóricos sobre los cuales se utiliza el análisis funcional de la comunidad microbiana como una herramienta que permite delinear claramente el efecto de los grupos funcionales y la respuesta de estos grupos en un dado ecosistema, de manera que si se planifica realizar un manejo del mismo, se cuente con rasgos que caractericen el funcionamiento del ecosistema.

## **FUNDAMENTOS DEL ANÁLISIS FUNCIONAL**

Las condiciones ambientales (temperatura, humedad, pH, recursos) pueden afectar la actividad microbiana sin alterar la diversidad de especies, modificando la velocidad de los procesos, manteniendo la diversidad a corto plazo. Es por tal motivo, que la estructura funcional de comunidades microbianas ha sido

ampliamente utilizada como indicador biológico, debido a la sensibilidad a los cambios y a su capacidad de proveer información que integre diversos factores ambientales (Alkorta *y col.*, 2003).

La estructura de las comunidades microbianas puede ser determinada al definir las capacidades metabólicas de los microorganismos y sus consecuencias biogeoquímicas (heterótrofos, nitrificadores, desnitrificadores, fijadores de nitrógeno, entre otros) y/o participación en procesos del ecosistema (descomposición, biodegradación, oxidación, entre otros), delimitando grupos funcionales como unidades estructurales de la comunidad (Hooper *y col.*, 2002).

**Grupos Funcionales.** Las interacciones entre las poblaciones que conforman la comunidad determinan la distribución espacial de las especies en función de la forma en cómo los recursos del hábitat son utilizados. Por tanto es frecuente encontrar grupos de especies diferentes que utilizan los mismos recursos, y a estos grupos de especies se les denomina gremio (Madigan *y col.*, 2003).

El concepto de gremio es muy utilizado en estudios de ecología, incluso se encuentran en la literatura estudios orientados a determinar la estructura de gremios de la comunidad (Atlas *y Bartha*, 2002), ya que un análisis gremial se trata de un análisis del nicho de especies parecidas (Pianka, 1979). Sin embargo, este concepto está referido sólo a aquellas poblaciones que utilizan los mismos recursos pero no a la forma en cómo estos recursos son utilizados. Como ejemplo de análisis gremial microbiano, se tiene el patrón de utilización de sustratos en el que se describe a la comunidad en función de su estructura de gremios: nitrificadores, celulolíticos, proteolíticos, entre otros. (Bastardo, 1991; Bastardo, 2005). Un análisis de este tipo permite estudiar los mecanismos de estructuración comunitaria; sin embargo, con este enfoque es difícil hacer comparaciones entre comunidades muy diferentes (Pianka, 1979).

Análogamente, existe el concepto de grupo funcional, que se refiere al conjunto de organismos que muestran una respuesta similar al ambiente o tienen un efecto similar sobre la mayoría de los procesos del ecosistema (Gitay *y Noble*, 1997; Bastardo,

2005). Cada grupo funcional está constituido por un número variable de especies, caracterizadas por la utilización de los recursos disponibles de manera similar y, por lo tanto, compiten entre ellas (Huston, 1994). Para delimitar un grupo funcional se hace una caracterización del perfil fisiológico de la comunidad, el cual refleja el potencial bioquímico del microorganismo para responder ante diversos sustratos o la presencia de enzimas particulares y rutas metabólicas (Buyer y Drinkwater, 1997; Bending *y col.*, 2004). Por tal motivo, los grupos funcionales microbianos generalmente son interpretados como gremios; sin embargo, los gremios no discriminan entre macro y microorganismos, mientras que, los grupos funcionales pueden incluir varios gremios (Hooper *y col.*, 2002). Por ejemplo, el grupo funcional constituido por nitrificadores incluye todos los microorganismos nitrificadores heterotróficos, autotróficos y mixotróficos.

La identificación de grupos funcionales en un determinado ecosistema permite hacer una evaluación precisa de sus propiedades, tales como capacidad de recuperación y regeneración, potencial degradativo, producción de materia orgánica y resistencia a cambios ambientales. Además, la estimación de la diversidad de grupos funcionales permite determinar la complejidad estructural, y comprender las interacciones entre los componentes bióticos (Gitay y Noble, 1997; Hooper *y col.*, 2002).

Uno de los principios más aceptados en ecología de sistemas establece que una mayor diversidad de especies dentro de los grupos funcionales de un ecosistema lo hace más resistente a cambios ambientales más o menos abruptos. La homeostasis del sistema, es decir, su capacidad de mantenerse dentro de ciertos límites en sus propiedades funcionales (productividad, ciclaje de nutrientes) y estructurales (dominancia y proporción de formas de vida), está relacionada aparentemente con la riqueza de especies dentro de los grupos funcionales (Griffiths *y col.*, 1997).

Este principio no tiene comprobaciones experimentales (Tilman *y col.*, 1997) pero se admite conceptualmente, que las especies de un cierto grupo funcional no son idénticas, sino que difieren de una manera cuantitativamente moderada en sus requerimientos, resistencias a stress ambientales, tasas de

crecimiento relativo, y otras propiedades relacionadas con su capacidad competitiva.

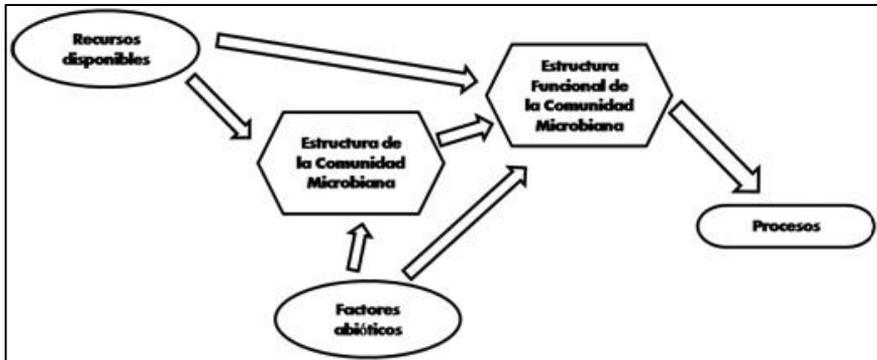
En la literatura se han planteado diversas teorías ecológicas que tratan de explicar los diferentes procesos que permiten el mantenimiento de los ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos, y todas ellas coinciden en el papel relevante que tienen las comunidades microbianas en el funcionamiento de los ecosistemas (Colwell, 1997). El concepto del *microbial loop* (Sherr y Sherr, 1988) plantea que son las comunidades microbianas y no el plancton, la base de las cadenas tróficas en los fondos pelágicos. De la misma forma, el enfoque utilizado por Junk *y col.* (1989) para explicar la importancia ecológica de los pulsos de inundación en el régimen hidrológico de los grandes ríos, implica el rol fundamental de los microorganismos en la biogeoquímica variable de estos sistemas.

En este sentido, Lawton y Brown (1993) consideran que si todos los grupos funcionales están representados en un ecosistema, el funcionamiento de éste no depende la diversidad de especies. En otras palabras, dentro de los grupos funcionales las especies son redundantes o sustituibles. Esto puede ocurrir cuando las especies que quedan dentro de un grupo funcional son capaces de compensar a las especies desaparecidas. Estos autores proponen además la hipótesis de remaches, en la cual se sugiere que todos los grupos funcionales tienen una significativa contribución al funcionamiento del ecosistema al igual que cada remache tiene contribución al funcionamiento de un aeroplano (Lawton y Brown, 1993; Lawton, 1994).

Por tanto, la identificación de los grupos funcionales del ecosistema, y de las especies que lo constituyen, es un elemento de gran potencia para estimar el valor relativo de las especies para la estabilidad del mismo.

**Estimación de la Estructura Comunitaria.** Las comunidades cambian a lo largo del tiempo tanto en estructura como en organización (sucesión). Es decir, una comunidad puede convertirse en otra de forma gradual, debido a que son sistemas abiertos con flujos de materia, energía y organismos; por lo que se habla de variabilidad espacio-temporal (Begon *y col.*, 2006). Los cambios en las condiciones abióticas (temperatura, humedad,

disponibilidad de recursos, entre otras) se reflejan en la respuesta fisiológica de la comunidad microbiana, y en consecuencia, se modifica la dirección y velocidad de los procesos en los cuales participan, puesto que se modifica la estructura de la comunidad. La Figura 1 representa un esquema hipotético de las relaciones que existen entre la comunidad microbiana, el ambiente y el ecosistema.



**Figura 1.** Relaciones entre la comunidad microbiana, ambiente y ecosistema (tomado de Zamora, 2012).

Para las determinaciones de la composición de las comunidades microbianas, se han desarrollado técnicas no dependientes del cultivo, tales como la determinación de perfiles de la composición de lípidos extraídos de muestras ambientales. El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) consiste en la esterificación de los lípidos extraídos de muestras, seguida de separación e identificación por medio de cromatografía de gases (Kirk y col., 2004). Similar a esta metodología, se utiliza también el análisis de ácidos grasos fosfolípidos (PLFA), la cual es una metodología basada en la determinación de ácidos grasos “firma” (fosfolípidos particulares de ciertos microorganismos) que permiten la identificación de un gran número de hongos, actinomicetos Gram(+) y bacterias Gram(-) (Buyer y Drinkwater, 1997). Este método presenta limitaciones debido a que, en muchos microorganismos no se han identificado estos fosfolípidos firma, por lo que no se cuantifican.

Recientemente, surge la aproximación metagenómica, que busca analizar el genoma de comunidades de microorganismos presentes en un ambiente particular. Esta metodología involucra herramientas de biología molecular, como el aislamiento directo del ADN de un ambiente determinado, seguido por la clonación del metagenoma completo en un vector apropiado, la secuenciación directa de este ADN ambiental o la amplificación de secuencias de interés para análisis de función (Sleator *y col.*, 2008). Esta aproximación permite el análisis de operones enteros que codifican vías catabólicas o biosintéticas, estudiar la diversidad de genes naturales y relacionarlos con sus productos, además de inferir la función de los microorganismos específicos dentro de su hábitat (Schmeisser *y col.*, 2007).

Análogamente, la caracterización funcional ha sido ampliamente utilizada para estimar la estructura comunitaria. La importancia del uso de técnicas basadas en el cultivo de microorganismos se fundamenta en que la funcionalidad es una mejor forma de determinar el rol de las comunidades microbianas en el ambiente en que se desenvuelven, la cual es una información que podría complementar la diversidad taxonómica y genética (Zak *y col.*, 1994).

La caracterización funcional se fundamenta en la determinación del perfil fisiológico de la comunidad, por medio de un conjunto de sustratos y fuentes de carbono a los cuales los microorganismos son enfrentados con el fin de establecer un patrón característico de respuesta *in vitro*. Esta metodología implica el aislamiento de cepas microbianas cultivables y su caracterización bioquímica de manera individual, obteniendo finalmente un registro bioquímico comparable con los demás aislados de la misma muestra. El perfil de utilización de sustratos proporciona información relacionada con las tasas de utilización de los mismos, la capacidad de utilización total o parcial, y además, puede ser determinado a través de un número finito de sustratos potenciales.

En los últimos años, la ecología microbiana se ha enfocado en caracterizar el perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP), cuya ventaja es que no requiere el aislamiento de cultivos axénicos. Para ello se emplean las ecoplacas de Biolog™, (Biolog Inc.,

Hayward, CA, USA), microplacas que contienen diferentes fuentes de carbono cuyo patrón de utilización es determinado a través de densidad óptica ( $DO_{595}$ ). Al finalizar la incubación, se obtiene un patrón específico de actividad que representa los atributos funcionales de la comunidad bacteriana inoculada con respecto a los sustratos evaluados (Zak *y col.*, 1994; Fraç *y col.*, 2012).

Asimismo, se emplea la caracterización del perfil funcional de la comunidad para evaluar la estructura de gremios de la comunidad, en la cual, se pretende estimar distintos grupos microbianos activos en cuanto al uso de recursos; ésto resulta en una aproximación que complementa a las determinaciones realizadas con métodos bioquímicos y moleculares (Nichols, 2007). En este tipo de determinación, se agrupan los microorganismos de acuerdo a su potencial de degradar un sustrato en particular, por ejemplo, en el gremio de celulolíticos se agrupan todos los microorganismos que degradan celulosa. De esta manera, se establece un patrón de utilización de recursos en un ambiente determinado y a través de este se infieren variaciones espaciales y temporales en la estructura de la comunidad microbiana (Bastardo, 2005).

#### **Aspectos metodológicos para delimitar grupos funcionales.**

La metodología para separar los diferentes grupos funcionales consiste en traducir el registro bioquímico de cada cepa o aislado en un hiperespacio  $n$  dimensional; donde esta dimensión estaría dada por el número de pruebas bioquímicas realizadas en la caracterización. En este hiperespacio la ubicación de una cepa será dada por los valores de cada una de estas pruebas (Ramos, 1996; Malaver, 1996). Se obtiene entonces una matriz  $S \times \tau$ ; donde  $\tau$  es el número de características funcionales medidas en  $S$  especies (Petchey y Gaston, 2002; Ricotta, 2005).

Luego, la matriz de características es convertida en una matriz de distancia  $\Delta$  de elementos  $d_{ij}$  que representan la distancia funcional entre la especie  $i$  hasta la especie  $j$ ; tal que  $d_{ii} = 0$  y  $d_{ij} = d_{ji}$  para cualquier  $i \neq j$ . Finalmente, la matriz de distancia es agrupada mediante métodos multivariados estándar (Métodos de Aglomeramiento Jerárquicos o análisis de Cluster) con el fin de separar las especies en los diferentes grupos funcionales (Ramos, 1996; Gitay y Noble, 1997; Roscher *y col.*, 2004; Ricotta, 2005).

**Aspectos metodológicos para caracterizar la estructura comunitaria usando CLPP.** Los datos de DO<sub>595</sub> para cada sustrato evaluado en las Ecoplacas de Biolog™ son utilizados para determinar el promedio de desarrollo del color por cada celda (AWCD) (Garland y Mills, 1991; Staddon *y col.*, 1997) o el área trapezoidal para el tiempo de incubación (Hackett y Griffiths, 1997; Preston-Mafhan *y col.*, 2002). En ambos casos, es común correlacionar estos datos a través de un análisis de componentes principales (PCA) o un análisis de redundancia (RDA) como una técnica estadística de ordenación a fin de determinar las semejanzas entre las comunidades estudiadas y que normalmente incluyen variables abióticas (Staddon *y col.*, 1997; Kaufmann *y col.*, 2004; Fraç *y col.*, 2012).

**Aspectos metodológicos para delimitar la estructura de gremios microbianos.** La estructura de gremios de la comunidad es determinada a partir del patrón de respuesta de cada microorganismo aislado ante un conjunto de sustratos o fuentes de carbono. Así, para cada sustrato se determina la proporción de cepas que lo utilizan como fuente de carbono y energía, obteniendo finalmente un valor de frecuencia relativa (N° cepas que utilizan el sustrato/ N° total de cepas). Estos valores podrían ser comparados con los aislados de diferentes comunidades, o utilizados para establecer los procesos en los cuales los microorganismos están involucrados (Bastardo, 2005; Torres y Lizarazo, 2006).

**Estimación de la Diversidad Funcional.** Además de la estructura comunitaria, determinar la diversidad funcional permite comprobar si existen patrones espaciales y temporales en una comunidad. La manera más común de determinar la diversidad funcional es cuantificar el número de grupos funcionales.

La diversidad funcional de comunidades microbianas también se puede conocer mediante la estimación de un índice de diversidad funcional, el cual permite establecer comparaciones entre comunidades distintas y/o seguir la evolución de una comunidad en específico frente a las variaciones de parámetros ambientales. Dicha comparación se hace a través de un número (el índice), que sugiere de forma cuantitativa el grado de semejanza en la estructura de dos o más comunidades.

A partir del análisis de cluster utilizado para lograr la separación de especies en grupos funcionales, Petchey y Gaston (2002) proponen que el índice de diversidad funcional sea la longitud total de las ramas del dendrograma obtenido en la separación de los grupos. Sin embargo, el índice más utilizado para estimar la diversidad funcional de comunidades microbianas es el Índice de Shannon-Weaver, que se calcula a partir de datos cuantitativos obtenidos a partir del perfil fisiológico de la comunidad (Garland y Mills, 1991; Zak *y col.*, 1994; Buyer y Drinkwater, 1997; Bending *y col.*, 2004; Diaz-Borrego *y col.*, 2007; Fraç *y col.*, 2012).

Asimismo, son utilizados también los índices de Simpson y McIntosh (Staddon *y col.*, 1997); sin embargo, la diversidad que se mide de esta manera es la diversidad de sustratos que potencialmente son utilizados por los microorganismos integrantes de la comunidad en cuestión, más no provee información sobre la estructura comunitaria.

## **METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL PROPUESTA POR RAMOS (1996)**

A fin de estimar los atributos comunitarios, Ramos (1996), propuso una metodología de análisis funcional de microorganismos que permite no sólo determinar la diversidad de sustratos utilizados por los aislados microbianos, sino también estimar la estructura comunitaria. Este análisis difiere de los mencionados anteriormente ya que utiliza cepas microbianas aisladas a partir de muestras ambientales de diferente procedencias (suelo, agua, aire, hidrocarburos y lodos entre otros) y cuya caracterización bioquímica se realiza usando diferentes sustratos escogidos por el investigador según el objetivo de su estudio (sustratos carbonados, rutas metabólicas, degradación de compuestos orgánicos, entre otros).

**Delimitación de Grupos Funcionales.** Esta metodología aborda inicialmente la delimitación y cuantificación de grupos funcionales (GF) utilizando la técnica multivariada de cluster mediante el algoritmo de agrupación simple o vecino más cercano, donde la disimilitud entre grupos es medida a través de la distancia Euclidiana. Este procedimiento permite obtener

gráficamente a través de un dendrograma las coincidencias tanto positivas como negativas (ausencia o presencia de utilización) de cada cepa, y por tanto, provee una estimación de la similitud total entre las cepas que conforman los grupos.

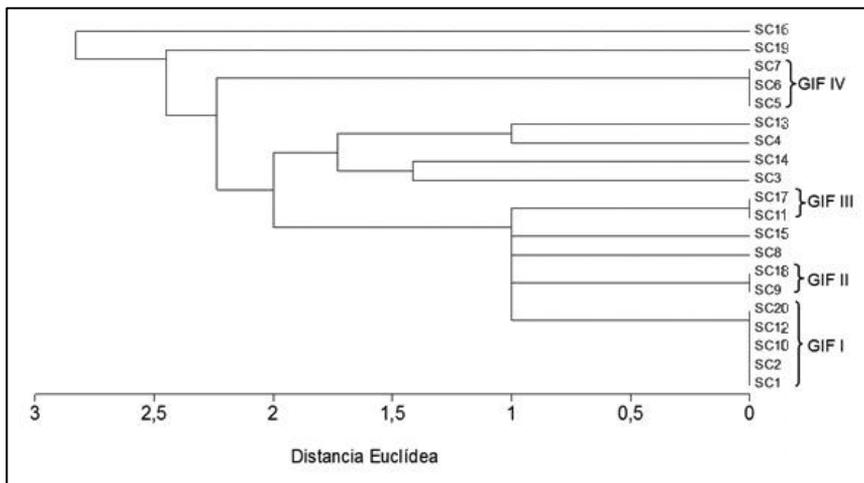
Resulta evidente que dos cepas funcionalmente equivalentes tendrán los mismos valores y se ubicarán en un mismo punto en el hiperespacio, esto significa que la distancia entre ellas es cero y se pueden considerar como superpuestas y funcionalmente idénticas respecto a los sustratos probados; y es equivalente a un GF formado por dos o más cepas que realizan igual función en la comunidad. Esto es lo que se denomina Grupo de Identidad Funcional (GIF). Para cada GIF se puede calcular el índice de importancia de cada cepa dentro de los grupos funcionales ( $P_i$ ). Este índice de importancia es una expresión que viene dada por el número de cepas agrupadas en un GIF en relación al número total de cepas.

En síntesis, de acuerdo al análisis funcional propuesto por Ramos (1996) a partir del dendrograma obtenido del cluster se pueden discriminar los diferentes GF que se forman y la distancia a la cual se separan, donde se puede notar que cada cepa individual que difiere de las demás representa un GF distinto dentro de la comunidad. Esta información permite establecer relaciones de similitud entre los grupos componentes de la comunidad, lo cual se interpreta a partir de la forma en cómo se agrupan los GF en el espacio.

Como ejemplo del procedimiento, la Figura 2 representa el análisis de cluster de 20 cepas bacterianas aisladas de un suelo de Santa Bárbara, estado Monagas (Zamora *y col.*, 2012a). Se pueden cuantificar 12 GF, representados por cada rama del dendrograma, y aunque comparten ciertas características funcionales, son diferentes entre sí. Asimismo, se observa que se forman 4 GIF, identificados como GIF I ( $P_i=0,25$ ), GIF II ( $P_i=0,1$ ), GIF III ( $P_i, 0,1$ ) y GIF IV ( $P_i=0,15$ ).

**Equivalencias Funcionales.** Se entiende como equivalencia funcional la formación de un GIF que incluye cepas de distinto tipo u origen, por ejemplo, bacterias aeróbicas y anaeróbicas, o bacterias y hongos, u hongos taxonómicamente distintos (Antía, 1995; Zamora, 2012b). Cuando hay más de una especie con un

papel ecológico similar en un sistema, se consideran funcionalmente redundantes, y pueden desempeñar un papel importante en garantizar la estabilidad del ecosistema cuando algunas especies se pierden debido a cambios ambientales, como el cambio climático.



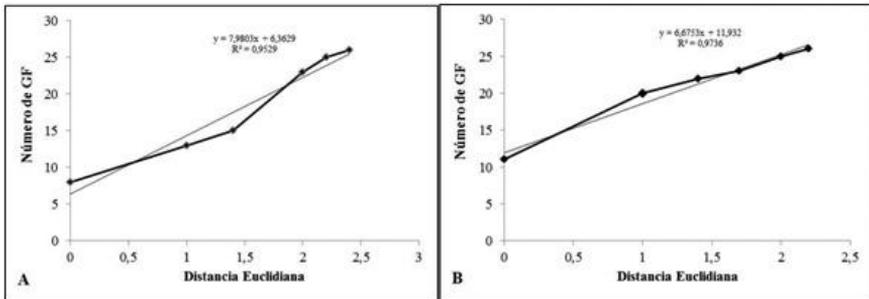
**Figura 2.** Dendrograma de agrupamiento de cepas bacterianas de un suelo (tomado de Zamora, 2012).

Estas equivalencias funcionales permiten explicar la estabilidad funcional de las comunidades microbianas. Esto basado en el hecho de que variaciones ambientales; por ejemplo, de orden climático, serán amortiguadas por la aparición de especies funcionales que reemplazan las afectadas por dicha variación (según hipótesis de Lawton y Brown, 1993). Asimismo, este enfoque del análisis abre la posibilidad de que, independientemente de su clasificación taxonómica, puedan integrarse ensamblajes de microorganismos con interés biotecnológico, siempre y cuando sean funcionalmente compatibles o complementarios.

**Curvas de reclutamiento.** De igual manera, la forma en cómo se agrupan los GF en el espacio delimitación de grupos funcionales permite establecer relaciones de similitud entre los

grupos que conforman la comunidad. Estas relaciones de similitud entre los GF se pueden evidenciar gráficamente a través de Curvas de Reclutamiento de Grupos Funcionales, las cuales se construyen sobre un eje cartesiano donde se representa en el eje X la distancia de agrupamiento, y en el eje Y el número de grupos funcionales agrupados a esa distancia (Figura 3). Mientras mayor sea la pendiente de la curva, menor es la diferencia entre los grupos y las funciones que realizan; es decir, menor diversidad funcional en la comunidad (Ramos, 1996).

La Figura 3 representa un ejemplo de la interpretación de la diversidad funcional de dos comunidades, A y B a través de curvas de reclutamiento. A partir de esta gráfica se interpreta que la comunidad B es más diversa funcionalmente con respecto a la comunidad A, debido a que los grupos funcionales se agrupan a una distancia mayor, y en consecuencia, la curva es menos pronunciada, indicando mayor diversidad funcional (ver ecuación de la curva).



**Figura 3.** Curvas de reclutamiento de grupos funcionales. (A) suelo prístino; (B) suelo sometido a biotratamiento (adaptado de Peña, 2005).

**Distancia Máxima de Agrupamiento.** Profundizando aún más el análisis de agrupamiento, el análisis funcional propuesto por Ramos (1996), también incluye la interpretación de los valores de Distancia Máxima de Agrupamiento (DMA) de cada dendrograma. Esta es la mayor distancia a la cual se separan los grupos funcionales, puede utilizarse como criterio comparativo de diversidad de dos o más comunidades separadas en el espacio y en el tiempo; mientras mayor es el valor de la distancia máxima

de agrupamiento la comunidad es más heterogénea. Esto es de gran utilidad en aquellos estudios en los cuales se pretende comparar la diversidad en sitios diferentes, o si las condiciones se mantienen el tiempo.

Para ejemplificar este aspecto, la Tabla 1 muestra los resultados del análisis funcional obtenidos por Zamora (2006), quien utilizó la interpretación de la DMA como criterio para comparar comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos bajo diferentes condiciones de tratamiento, siguiendo el comportamiento de dichas comunidades en el tiempo. Basado en los valores de DMA indicados en la Tabla 1, se concluyó que en presencia de hidrocarburos ocurría una restricción de la diversidad funcional en el tiempo, debido a que la distancia a la que se separaron los GF disminuyó notablemente al final del experimento, particularmente en aquellos microcosmos contaminados con hidrocarburos.

**Tabla 1.** Distribución de grupos funcionales y diversidad funcional de cada microcosmos en presencia de hidrocarburos (modificado de Zamora, 2006).

| Tratamiento | Grupo Funcional |       | Grupo de Identidad Funcional |       | Índice de Diversidad Funcional |       | Distancia Máxima de Agrupamiento |       |
|-------------|-----------------|-------|------------------------------|-------|--------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
|             | Inicio          | Final | Inicio                       | Final | Inicio                         | Final | Inicio                           | Final |
| <b>C</b>    | 12              | 20    | 4                            | 0     | 0,6                            | 1,0   | 2,8                              | 2,4   |
| <b>CB</b>   | 20              | 18    | 0                            | 1     | 1,0                            | 0,9   | 2,8                              | 2,2   |
| <b>TCF</b>  | 18              | 14    | 1                            | 4     | 0,9                            | 0,7   | 3,5                              | 1,7   |
| <b>TSF</b>  | 18              | 16    | 2                            | 1     | 0,9                            | 0,8   | 2,2                              | 1,7   |

C: control; CB: control biótico; TCF: tratamiento con fertilizante; TSF: tratamiento sin fertilizante.

**Índice de Diversidad Funcional.** Finalmente, el análisis funcional incluye el cálculo del Índice de Diversidad Funcional (IDF), el cual permite cuantificar la diversidad de una comunidad en términos de su actividad bioquímica degradativa. El índice se determina realizando para un dendrograma dado, el cociente entre el número de grupos o cluster formados entre el número total de aislados considerados para realizar el dendrograma, y como resultado se obtiene un número acotado entre 0 y 1; donde 1 representa el valor máximo de diversidad. En el caso del ejemplo de la Figura 2, el IDF es 0,6; que corresponde a la relación entre los 12 GF formados respecto al total de cepas (20 cepas).

## **APLICACIONES DEL ANÁLISIS FUNCIONAL EN ESTUDIOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA EN VENEZUELA**

En Venezuela, los estudios sobre estructura de comunidades microbianas y la diversidad funcional en ambientes acuáticos y terrestres son escasos basándose en su mayoría, en el caso de los ambientes acuáticos en el estudio de sucesiones bacterianas durante los procesos de descomposición de materia vegetal (Bastardo, 1988; Bastardo, 1993; Bastardo, 1999).

**Indicadores de calidad de ambientes acuáticos.** Los estudios de Bastardo *y col.*, (2007) en el río Orinoco, contemplan la importancia de la funcionalidad metabólica que desarrollan los microorganismos en el ecosistema. Estudiaron los cambios en la estructura funcional de la comunidad bacteriana en el tiempo y el espacio y establecieron grupos indicadores que podían ser utilizados para evidenciar condiciones de alteraciones ambientales e identificar potenciales áreas prioritarias de conservación.

Díaz-Borrego *y col.* (2007) emplean el análisis funcional para estudiar la utilización de sustratos orgánicos y resistencia a metales pesados por bacterias asociadas a *Lemna* spp. y del agua circundante provenientes del Lago de Maracaibo; cuantificaron, aislaron e identificaron bioquímicamente las bacterias y la comunidad bacteriana se caracterizó por ser capaz de utilizar entre las fuentes carbonadas los azúcares simples, almidón, proteínas y lípidos e incapaz de hidrolizar ADN. En los GF que se forman comparten presentar actividad sacarolítica y proteolítica y mostraron una resistencia a metales pesados posiblemente debido a la descargas de aguas residuales industriales que son vertidas al lago, destacando la contribución de la comunidad bacteriana al reciclaje de nutrientes en el ecosistema acuático.

**Caracterización de comunidades bacterianas asociada a síndrome enfermedad de corales y esponjas.** García *y col.* (2004) utilizaron el análisis funcional para estudiar algunos aspectos funcionales de comunidades bacterianas asociadas a la capa de mucopolisacáridos en tejidos sanos y enfermos del coral *Montastraea annularis* con síndrome de banda amarilla (SBA,) determinando que las características metabólicas de las

comunidades asociadas al agua y al mucus presente en tejidos sanos y enfermos con SBA, fueron diferentes. Además detectaron cambios en las características metabólicas normales de las comunidades bacterianas, respecto a la preferencia de utilización de fuentes de carbono y otros sustratos como una respuesta a cambios ambientales o al estado fisiológico del hospedador.

Siguiendo esta línea de investigación, Valero (2004) utilizó el análisis funcional para determinar diferencias entre comunidades bacterianas en un gradiente espacial en el tejido de coral *Montastraea faveolata* con síndrome de banda amarilla (SBA). El análisis permitió determinar que la comunidad bacteriana heterotrófica cambia en dicho gradiente, desde el tejido sano hasta el tejido con síndrome de banda amarilla, a partir del inicio del síndrome hasta el tejido necrotizado, incluyendo el agua circundante. Se concluyó que las características bioquímicas de los aislados bacterianos guardan relación con la enfermedad.

De igual manera, Croquer (2004) caracterizó funcionalmente las comunidades bacterianas asociadas al mucus de tejidos sanos y afectados por la enfermedad de plaga blanca de *Madracis mirabilis*, encontrando que el patrón metabólico de la comunidad asociada al mucus del tejido aparentemente afectados resultó diferente a las comunidades de bacterias de tejidos sanos y agua circundante.

Romero (2007) utilizó el análisis funcional para comparar funcionalmente la comunidad de bacterias heterotróficas de tejidos sanos y enfermos de la especie de esponja *Aplysina archeri*, determinando similitudes entre las comunidades bacterianas asociadas al tejido sano y enfermo, mientras que la comunidad de bacterias aisladas del tejido de zona de transición “sano-enfermo” fue muy diferente; y estas comunidades a su vez guardaban poca relación con la comunidad bacteriana presente en el agua circundante. Destacando que la comunidad bacteriana asociada a *Aplysina archeri*, aislada del tejido de la esponja es funcionalmente diferente a la del agua circundante, y sugieren que la evolución de dicha comunidad puede estar asociada a las condiciones imperantes en los tejidos de la esponja como nicho ecológico.

**Caracterización de suelos en prácticas agroecológicas.**  
Antia (1995) Durante periodo de lluvia y sequía, analizó la estructura funcional de comunidades microbianas heterotróficas

en suelos de sabana sometidos a manejo agrícola, encontrando equivalencias funcionales tipo hongo-hongo, bacteria-bacteria y hongo-bacteria, que le permitieron concluir que en suelos sometidos a manejo agrícola hay desaparición de poblaciones bacterianas y que éstas fueron sustituidas en el ecosistema por hongos funcionalmente equivalentes, manteniendo así la estructura funcional de la comunidad.

Hernández *y col.* (2006) utilizaron la estructura funcional de la comunidad microbiana como un indicador del efecto que tienen las prácticas de manejo agrícola sobre la dinámica de mineralización biológica, encontrando variaciones en el perfil bioquímico de las comunidades y que las diferentes prácticas de manejo pueden influir sobre la abundancia y función de las comunidades microbianas.

Este aspecto fue también abordado por Hernández (2008) quien relacionó la estructura de comunidades microbianas con procesos edáficos en un suelo sometido a manejo agrícola. El análisis funcional le permitió discriminar las diferencias entre comunidades microbianas en suelos sometidos a diferentes tratamientos, determinando que la estructura funcional comunitaria depende de la disponibilidad de sustratos orgánicos y de las condiciones fisicoquímicas del suelo.

Díaz-Borrego *y col.* (2007) evaluaron la diversidad funcional bacteriana, a través del estudio de la estructura funcional de las comunidades heterotróficas de suelos cultivados con *Psidium guajava* L. (guayaba) y suelos control (no cultivados) y la relacionaron con las características fisicoquímicas de los suelos. Reportan 50 GF diferentes, de los cuales 19 son exclusivos para el suelo cultivado y 7 GF para el no cultivado. La similitud en las características fisicoquímicas de los suelos está influenciada por el tipo de cultivo establecido. No encontraron diferencias en la diversidad funcional bacteriana de ambos suelos.

**Caracterización de suelos impactados por la actividad petrolera.** Peña (2005) empleó el análisis funcional como herramienta para comparar dos localidades en las cuales el suelo estuvo impregnado con hidrocarburos (HC), una sometida a confinamiento y la otra sometida a biorremediación. Realizó curvas de reclutamiento a través de las cuales se evidenció que la

(DMA) distancia euclidiana que separa los grupos funcionales era mayor en comunidad microbiana proveniente del biotratamiento, concluyendo que ésta era funcionalmente más diversa que la sometida al confinamiento.

También Reyes (2009) evaluó el efecto de las emulsiones asfálticas sobre la estructura comunitaria microbiana asociada a los microagregados de un suelo de sabana mediante el análisis funcional, encontrando que la adición de la emulsión asfáltica al suelo favoreció la estabilización de los microagregados sin alterar el patrón funcional de bacterias y hongos. El análisis funcional permitió evaluar si la comunidad microbiana de los microagregados era afectada funcionalmente por la adición de un agente exógeno (la emulsión asfáltica) y concluyó que el patrón bioquímico de hongos y bacterias no cambiaba significativamente en el tiempo.

Barrios (2010) y Salas (2010), realizaron estudios de caracterización funcional de comunidades microbianas (bacterianas y fúngicas) asociadas a suelos impactados por la actividad petrolera, en el Bloque Junín de la Faja Petrolífera del Orinoco, específicamente en la fosa, ubicada en campo operacional Bared 9 del Distrito San Tomé, Municipio Miranda del Estado Anzoátegui.

Barrios (2010) caracterizó funcionalmente a la comunidad bacteriana asociada a suelos del borde de la fosa, se conformaron grupos funcionales con características similares en sus respuestas frente a diferentes sustratos constituidos en mayor medida por cepas proteolíticas, utilizan urea, reducen nitrato y con capacidad de utilizar el acetato como única fuente de carbono. Por otra parte, la presencia de cepas bacterianas con actividad hemolítica y capacidad de crecer en medio acetato como única fuente de carbono y en presencia de petróleo indica adaptación de la comunidad a la presencia de hidrocarburos y muestra capacidad potencial para producir biosurfactantes. Infiriendo unas características de resiliencia del ecosistema, asociada a la capacidad de respuesta de la comunidad bacteriana frente a contaminantes tipo hidrocarburo, que garantizaría la estabilidad del sistema.

Salas (2010) utilizó el análisis funcional para comparar comunidades bacterianas y fúngicas de suelos tomados a lo

largo de un gradiente del área de influencia de la fosa, asumiendo mayor perturbación en la zona cercana al borde de la fosa Bared 9 y compara con un suelo control no impactado. Reporta una importante acción degradativa tanto para hongos como bacterias sobre sustratos carbonados simples y complejos, además utilizan urea, por lo que plantea juegan un papel importante en el ciclaje de nutrientes. El análisis funcional indica que las poblaciones fúngicas son funcionalmente más diversas que las bacterianas. Se formaron GIF entre cepas de ambas poblaciones de microorganismos, infiriendo una complementariedad de funciones en ambas poblaciones.

Asimismo, Zamora *y col.* (2012a) utilizaron el análisis funcional para comparar comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos bajo diferentes condiciones de tratamiento, siguiendo el comportamiento de dichas comunidades en el tiempo; concluyó que en presencia de hidrocarburos ocurría una restricción de la diversidad funcional respecto al suelo no contaminado en el tiempo, quizás por selección de GF capaces de tolerar la presencia de hidrocarburos. Al evaluar la estructura comunitaria luego de 120 días de incubación se evidenció que durante el biotratamiento hubo disminución de la concentración del contaminante, sin embargo la diversidad funcional no se restituyó a las condiciones iniciales.

**Determinación del Potencial Biotecnológico.** Cobra importancia establecer o incorporar en el estudio de las comunidades microbianas las interacciones que se establecen entre y dentro de los GF. Planteando la importancia de considerar las interacciones entre los microorganismos funcionalmente compatibles o complementarios en un ensamblaje con interés biotecnológico de tal manera que no vayan en detrimento del fin para el cual serían estructurados.

Bajo esta hipótesis, Malaver (1996) y Malaver y Ramos (1997) realizaron bioensayos para la biodegradación de fenol conformando un “pool” bacteriano, un “pool” fúngico y un “pool” mixto (hongos y bacterias), aislados de la rizósfera de *Eichhornia crassipes*, con el fin de determinar las interacciones entre los GF que incluyen diferentes grupos taxonómicos. Concluyeron que en el pool de bacterias las interacciones resultaron ser positivas o neutras, igualmente en el caso del pool fúngico; mientras que, en

el pool mixto las interacciones mostraron ser de tipo positivo, determinándose una degradación de fenol mucho mayor y en menor tiempo, que la encontrada en el pool bacteriano y fúngico por separado. Asimismo, plantearon que el ensamblaje hongos-bacterias resultaba más eficiente en el proceso de remoción de fenol.

Domínguez (2008) utilizó el análisis funcional para seleccionar cepas bacterianas y fúngicas aisladas del suelo de una fosa biotratada, con potencial biodegradativo para ser utilizadas en biorremediación de suelos impactados con hidrocarburos. Así, apoyándose en las características bioquímicas de hongos y bacterias pudo ensamblar consorcios microbianos y evaluar su eficiencia en la degradación de hidrocarburos. Concluyó que las relaciones de complementariedad o cooperación que se establecen entre los diferentes grupos microbianos, hacen que los consorcios hongos-bacterias sean más eficientes, en la degradación de hidrocarburos.

Windervoxhel *y col.* (2009) utilizaron la herramienta del análisis funcional, aplicado a aislados bacterianos procedentes de suelos impregnados con crudo. Las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente e identificada la respuesta enzimática ante una serie de pruebas bioquímicas, con el fin de determinar su capacidad para degradar sustratos complejos y producir metabolitos tenso-activos.

**Uso conjunto del análisis funcional y molecular.** León (2008) y León *y col.* (2009), utilizaron el análisis funcional en bacterianas cultivable asociada a rípios de perforación mezclados con fluidos de perforación base agua con la finalidad de identificar potenciales biocatalizadores que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación de la Faja Petrolífera del Orinoco. Consideraron como un criterio de selección de grupos funcionales aquellos constituidos por aislados con características fisiológicas de interés biotecnológico, tales como, aquellas cepas capaces de producir agentes tensoactivos (biosurfactantes) en el medio de cultivo, así como degradación de compuestos orgánicos complejos (celulosa, lignina, hidrocarburos). Las pruebas bioquímicas y el análisis funcional permitieron identificar 66 GF y 14 GIF; los estudios moleculares con la técnica denominada huella de ADN (DNA *fingerprinting*) indicaron la existencia de 14 bacterias

genotípicamente diferentes con alta capacidad hidrocarbónico-clástica y de producción de biosurfactantes, las cuales fueron identificadas molecularmente como pertenecientes a 5 géneros diferentes: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Comamonas*, mayoritariamente correspondientes a la familia Enterobacteriaceae, clase gamma-proteobacterias, frecuentemente asociada a ambientes contaminados con hidrocarburos. Esta selección previa con criterios ecológicos permitió aminorar los costos del estudio e incorporar la identificación taxonómica molecular de las cepas de interés.

**Determinación de patrones espacio-temporales de comunidades microbianas en suelos inundables.** Zamora (2012b) caracterizó espacial y temporalmente las comunidades microbianas heterotróficas (hongos y bacterias) asociadas al suelo de la planicie de inundación del Río Mapire, estado Anzoátegui, con la finalidad de determinar aquellos parámetros fisicoquímicos que influyen en los patrones de estructura y función comunitaria, en términos de variaciones en las condiciones fisicoquímicas y de humedad a lo largo de un gradiente topográfico. Determinó que la estructura funcional de las comunidades microbianas responde a cambios en el contenido de humedad del suelo y en la disponibilidad de sustratos orgánicos y, en menor medida, es afectada por el pH del suelo y su baja fertilidad. Además concluyó que la inundación no afecta negativamente la diversidad funcional, generándose cambios sucesionales en la comunidad microbiana como consecuencia de la dinámica del carbono del suelo. A través del análisis se determinó que el funcionamiento del ecosistema depende de la interacción entre los diferentes grupos funcionales en la comunidad microbiana, y por otra parte, las equivalencias funcionales entre los diferentes grupos sugieren que el sistema es altamente resiliente ante las perturbaciones anuales de inundación y sequía.

## **ALGUNAS CONSIDERACIONES DEL ALCANCE Y LIMITACIÓN DEL ANÁLISIS FUNCIONAL**

La comprensión mecanística de la relación biodiversidad-funcionamiento del ecosistema requiere de un enfoque funcional a través del cual se podría indicar el grado de resiliencia de un ecosistema particular, además de proporcionar información sobre

la dinámica de materia orgánica y flujo de nutrientes de la comunidad hacia el ecosistema.

Por otra parte, la falta de definiciones generalmente aceptadas de cómo se delimita un grupo funcional constituye una limitación; no hay homogeneidad de criterio con respecto a las propiedades eco-fisiológicas que permitan caracterizar a las especies pertenecientes a un grupo funcional, y además, en muchos sistemas hay especies que pueden pertenecer a dos o más grupos funcionales diferentes (Hooper *y col.*, 2002).

De los problemas asociados con la asignación de especies dentro de un grupo funcional, se tiene que: (i) el resultado depende del número y tipo de características funcionales que son medidas, y este aspecto es básicamente subjetivo, ya que depende en parte de los objetivos del estudio y (ii) las conclusiones sobre la diversidad funcional pueden frecuentemente depender de la escala arbitraria a la cual las diferencias entre las especies califican como funcionalmente significativas, en otras palabras, cuantos grupos son usados (Petchey y Gaston, 2002). Aunque las bacterias cultivables representan menos del 1% del total de bacterias habitando el suelo (Torsvik y Øvreås, 2002), en general los medios de cultivos selectivos permiten estimar distintos grupos bacterianos activos en cuanto al uso de recursos, lo cual resulta en una aproximación que complementa a las realizadas con métodos bioquímicos.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

La caracterización funcional constituye una buena alternativa para comprender el efecto de la biodiversidad sobre las propiedades del ecosistema. Permite delinear claramente el efecto de los grupos funcionales y la respuesta de estos grupos en un dado ecosistema, de manera que si se planifica realizar un manejo del mismo, se cuente con rasgos que caractericen el funcionamiento del ecosistema, más que la “caja negra” que representa la diversidad de especies y sus interacciones.

El análisis funcional de comunidades microbianas involucra la caracterización de patrones y procesos que permiten predecir la estabilidad del ecosistema ante perturbaciones y esclarecer las

interacciones entre los organismos que lo componen y el ambiente, obteniendo una relación de tipo diversidad-función. En otras palabras, sus resultados constituyen una base importante para entender parte de las relaciones entre las fuentes de carbono, nutrientes y contaminantes, con la actividad microbiana en el ecosistema. Sin embargo, esto puede ser difícil de determinar, tomando en cuenta que la producción microbiana está influenciada por cambios en los factores abióticos, y como consecuencia, ocurre un crecimiento más rápido y eficiente de especies o grupos microbianos particulares, que podrían ser favorecidos en períodos cuando el carbono orgánico disponible está cambiando. Por otra parte, la variación estacional de la cantidad relativa de material alóctono y autóctono en el ecosistema da lugar a procesos sucesionales dentro de la comunidad que podrían ser buenos indicadores de la dinámica del ecosistema.

En este sentido, al comparar espacial y temporalmente, los espectros funcionales de comunidades microbianas, es posible determinar diferencias entre comunidades a lo largo de un gradiente, o el efecto local y/o temporal de un agente exógeno, como por ejemplo un contaminante. Esto finalmente conlleva a estimar la magnitud de la transformación que induce el agente y sus consecuencias sobre la estabilidad y sustentabilidad de un ecosistema en particular.

Finalmente, basados en la estrecha relación de los microorganismos con los procesos ecológicos en los ecosistemas y su sensibilidad a las perturbaciones, se recomienda tomar en mayor consideración el estudio de las comunidades microbianas en aquellas investigaciones que involucren la evaluación integral del ecosistema. La línea de investigación evidencia la necesidad de utilizar las herramientas moleculares como análisis complementarios, que contemplen el uso de metodologías avanzadas, confiables y reproducibles, para estudiar la estructura de comunidades microbianas, de tal manera que faciliten resultados comparables a nivel mundial.

## **LITERATURA CITADA**

- Alexander, D.B. 1997. Bacteria and Archaea. En: *Principles and Applications of Soil Microbiology*. (D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel y D.A. Zuberer. Eds). New Jersey, USA, Prentice Hall. Cap. 3:44 – 71.

- Alkorta, I., A. Aizpurua, P. Riga, I. Albizu, I. Amezaga y C. Garbisu. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Review Environmental Health* 18: 65-73.
- Antía, A. 1995. Estudio Ecológico de las comunidades microbianas heterotróficas de un suelo en condiciones naturales y sometido a manejo agrícola. Postgrado en Ecología. Facultad de Ciencias, UCV. Tesis Doctoral. 145 pp.
- Atlas, R. y R. Bartha. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ta Edición. España, Addison Wesley. 677 pp.
- Barrios, A. 2010. Caracterización funcional de la comunidad bacteriana cultivable aislada del suelo de la zona de descarga de la fosa petrolera Bare-9. San Tomé. Edo. Anzoategui. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias de la UCV. Trabajo Especial de Grado. 80 pp.
- Bastardo, H. 1988. Estudio preliminar del proceso de descomposición en el bosque de manglar de la Laguna de Tacarigua. *Acta Científica Venezolana* 39: 184-185.
- Bastardo, H. 1991. Balance de nutrientes en una sabana inundable durante la descomposición de tres especies de gramíneas. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela.
- Bastardo, H. 1993. Decomposition process in *Avicenia germinans*, *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* under oil spill. *Acta Biológica Venezuelica* 14(2):53-60.
- Bastardo, H. 1999. El proceso de descomposición y su importancia ambiental. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela.
- Bastardo, H. 2005. Algunos aspectos del proceso de descomposición y la microbiología ambiental. *Acta Biológica Venezuelica* 25(1-2): 91-97.
- Bastardo, A., H. Bastardo y J. Rosales. 2007. Diversidad funcional de las bacterias heterótrofas del bajo río Orinoco, Venezuela. *Ecotropicos* 20(1):15-23.
- Begon, M., C.R. Townsend y J.L. Harper. 2006. *ECOLOGY: From Individuals to Ecosystems*. 4th Edition. Blackwell Publ. Ltd. USA. 737 pp.
- Bending, G.D., M.K. Turner, F. Rayns, M.C. Marx y M. Wood. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1785-1792.
- Buyer, J. y L. Drinkwater. 1997. Comparison of Substrate Utilization assay and Fatty acids analysis of soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 30:3-11.
- Childress, W. y P. Sharpe. 1992. A compartment model approach to bacteria population genetics and biodegradation. En: *Modeling the metabolic and physiologic activities of microorganisms* (C. Hurst. Ed). USA, John WileySons 2: 61 – 87.
- Colwell, R.R. 1997. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology* 18: 302-307.
- Croquer, A. 2004. Dinámica de las enfermedades de corales pétreos en los Parques nacionales Los Roques y Morocoy. Postgrado en Ciencias Biológicas Universidad Simón Bolívar. Tesis Doctoral. 221 pp.
- Díaz-Borrego, L., J. Dupontt., L. Cantini y L. Soto. 2007a. Diversidad funcional de las bacterias presentes en un suelo cultivado con guayaba (*Psidium guajava* L.). *Ciencia* 15(4): 388 – 397.
- Díaz-Borrego, L., J. Dupontt., K. Espina, N.Rincón, M. García y L. Atencio. 2007b. Utilización de sustratos orgánicos y resistencia a metales pesados por bacterias asociadas a *Lemna spp*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas LUZ*. 41(1): 27 – 43.

- Domínguez, D. 2008. Evaluación del potencial de una comunidad microbiana (hongos y bacterias) para biorremediar a escala de laboratorio un suelo contaminado artificialmente con crudo pesado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias de la UCV. Trabajo Especial de Grado. 86 pp.
- Emmerson, M., M. Solan, C. Emes, D. Paterson y D. Raffaelli. 2001. Consistent patterns and the idiosyncratic effect of biodiversity in marine ecosystems. *Nature* 411 (6833): 73 – 77.
- Fraç, M., K. Oszust y J. Lipiec. 2012. Community Level Physiological Profiles (CLPP), Characterization and Microbial Activity of Soil Amended with Dairy Sewage Sludge. *Sensors* 12: 3253-3268.
- García, A., A. Croquer y N. Malaver. 2004. Algunas características funcionales de las comunidades bacterianas del mucus asociado a tejidos sanos y con Síndrome de Banda Amarilla. *Interciencia* 29(1): 39-45.
- Garland, J. y A. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied Environmental Microbiology* 57:2351–2359.
- Gitay, H. y I.R. Noble. 1997. What are functional types and how should we seek them? En: *Plant functional types. Their relevance to ecosystem properties and global change.* (T.M. Smith, H.H. Shugart y F. Woodward. Eds.). England, Cambridge Univ. Press 1:3-19.
- Grayston, S. y C. Campbell. 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix europetis*) and Sitka Spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology* 16:1031–1038.
- Griffiths, B., K. Ritz y R. Wheatley. 1997. Relationship between Functional Diversity and Genetic Diversity in Complex Microbial Communities. En: *Microbial Communities. Functional vs. Structural Approach* (H. Insam y A. Røngger. Eds). USA, Springer. 1:1-9.
- Hackett C.A. y B.S. Griffiths. 1997. Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. *Journal of Microbiological Methods* 30:63–69.
- Hernández, C.L., J. Ramos y D. López-Hernández. 2006. Características de la comunidad microbiana y evaluación de algunos parámetros bioquímicos en dos sistemas de producción contrastantes en el estado Amazonas, Venezuela. *Agrobiológica* 3(5):15–21.
- Hernández, C.L. 2008. Interrelación entre las comunidades microbianas y los procesos edáficos de un suelo Agrícola, modificaciones inducidas por un abono orgánico. Postgrado en Ecología, Facultad de Ciencias UCV. Tesis Doctoral 191 pp.
- Hooper, D., M. Solan, A. Symstad, S. Díaz, M. Gessner, N. Buchmann, V. Degrange, P. Grime, F. Hulot, F. Mermillod-Blondin, J. Roy, E. Spehn y L. van Peer. 2002. Species diversity, functional diversity and ecosystem functioning. En: *Biodiversity and Ecosystem Functioning. Synthesis and Perspectives.* (M. Loreau, S. Naeem y P. Inchausti, Eds). Oxford University Press. Cap. 17:195-281.
- Huston, M. 1994. *Biological Diversity.* The coexistence of species on changing landscapes. Cambridge University Press. 681 pp.
- Junk, W.J., P. B. Bayley y R. E. Sparks. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. En: *Proceedings of the international Large River Symposium.* Dodge, D. P. (ed.) Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 106:110-127.
- Kaufmann, K. M., Christophersen, A. Buttler, H. Harms y P. Höhener. 2004. Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at experimental field site Værløse, Denmark. *FEMS Microbial Ecology* 48:387-399.

- Khöler, A., M. Schuttrof, D. Bryniok y H.J. Knanckmub. 1994. Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system. *Biodegradation* 5:93-103.
- Kirk, J., L. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J. Kliromonos, H. Lee y J. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58:169-188.
- Laine, M., H. Haario y K. Joergensen. 1997. Microbial functional activity during composting of chlorophenol-contaminated sawmill soil. *Journal of Microbiological Methods* 30:21-32.
- Lawton, J. y V. Brown. 1993. Redundancy in ecosystems. En: *Biodiversity and Ecosystem Function*. (E.D. Shulze y H. Money. Eds). Spring Berling. 11:255-270.
- Lawton, J. 1994. What do species in ecosystems? *Oikos* 71:367-374.
- León, Y.C., A. De Sisto, Y. Inojosa, N. Malaver y L. Naranjo-Briceño. 2009. Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la Faja Petrolífera del Orinoco. *RET Revista de Estudios Transdisciplinarios* 1(2):11-24.
- Madigan, M., J. Martingo y J. Parker. 2003. *Brock: Biología de los Microorganismos*. 10ª edn. Prentice Hall. 289 pp.
- Malaver, N. 1996. Aspectos ecológicos de la asociación microorganismos-raíz *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solm-Laub (Pontederiaceae) expuesta a un efluente modificado. Postgrado en Ecología, Facultad de Ciencias UCV. Tesis Doctoral. 287 pp.
- Malaver, N. y J. Ramos. 1997. Participación de los microorganismos perifíticos asociados a la raíz de la bora (*Eichhornia crassipes*) en la remoción de fenol. *Acta Biologica Venezuelica* 17(4):35-46.
- Nichols, D. 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbial Ecology* 60:351-367.
- Omori, T., L. Mona, Y. Saiki y T. Kodama. 1992. Desulfurization of Dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. *Applied Environmental Microbiology* 58:911-915.
- Petchey O.L. y K.J. Gaston. 2002. Functional diversity (FD), species richness and community composition. *Ecology Letters* 5:402-411.
- Peña, N. 2005. Evaluación geoquímica y microbiológica de localidades empleadas en el biotratamiento de desechos con hidrocarburos. Postgrado en Geoquímica, Facultad de Ciencias UCV. Tesis de Maestría. 156 pp.
- Pianka, E. 1979. *Evolutionary Ecology*. 2nd. Edition. USA, Harper y Row Publ. 387 pp.
- Preston-Mafham, J., L. Boddy y P. F. Randerson. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles - a critique. *FEMS Microbial Ecology* 42:1-14.
- Ramos, J. 1996. Modelos matemáticos y estadísticos y la biodegradación de crudos. Memorias del V Seminario Guayanés sobre Conservación del Ambiente. Puerto Ordaz, Estado Bolívar, Venezuela. 25 pp.
- Reyes, U.A. 2009. Efecto de emulsiones asfálticas sobre la estructura comunitaria microbiana en microagregados de un suelo de sabana. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias de la UCV. Trabajo Especial de Grado. 153 pp.
- Ricotta, C. 2005. A note on functional diversity measures. *Basic Applied Ecology* 6:479-486.
- Romero, M.A., N. Malaver y E. Villamizar. 2007. Caracterización funcional de la comunidad bacteriana heterotrófica asociada a la esponja *Aplysina archeri* (Porifera, Demospongiae). *Acta Biologica Venezuelica* 27(1):1-6.

- Roscher, C., J. Schumacher, J. Baade, W. Wilcke, G. Gleixner, W.W. Weisser, B. Schmid y E.D. Schulze. 2004. The role of biodiversity for element cycling and trophic interactions: An experimental approach in a grassland community. *Basic Applied Ecology* 5:107-121.
- Salas, M. 2010. Caracterización de una comunidad microbiana en suelos afectados por la actividad petrolera en el área de la fosa Bared 9, ubicada en el Estado Anzoátegui. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias UCV. Trabajo Especial de Grado. 108 pp.
- Sherr E. y Sherr B. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. *Limnology and Oceanography* 33(5):1225-1227
- Schmeisser, C., H. Steele, y W. R. Streit. 2007. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. *Applied Microbiology Biotechnology* 75:955-962.
- Sleator, R. D., C. Shortall, y C. Hill. 2008. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology* 47:361-366.
- Staddon, W.J., L.C. Duchesne y J.T. Trevors. 1997. Microbial Diversity and Community Structure of postdisturbance forest soils as determined by Sole-Carbon-Source Utilization Patterns. *Microbial Ecology* 34:125-130.
- Tilman, D., C. Lehman y K. Thomson. 1997. Plant diversity and productivity, theoretical considerations. *Proceedings of Natural Academy Science* 94: 1857-1861.
- Tilman, D. 2001. Functional diversity. En: *Encyclopedia of biodiversity*. (S.A. Levin. Ed) Academic Press. pp. 109-120.
- Torsvik, V. y L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5(3):240-245.
- Torres M. y L. Lizarazo. 2006. Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). *Agronomía Colombiana* 24(2):317-325.
- Trevors, J. 1998. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution* 101:45-67.
- Valero, S.A. 2004. Comunidades bacterianas asociadas al tejido de *Montastraea faveolata* con Síndrome de Banda Amarilla. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias de la UCV. Trabajo Especial de Grado. 93 pp.
- Windevoxhel. R., N. Sánchez, N. Subero, H. Bastardo y N. Malaver. 2009. Grupos funcionales de bacterias con potencial para Biodegradación de Hidrocarburos. *Revista Ingeniería UC* 16(12):51-53.
- Zak, J., M. Willing, D. Moorhead y H. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1101-1108.
- Zamora, A.C. 2006. Análisis funcional de comunidades bacterianas asociadas a un proceso de biorremediación de muestras de suelo contaminadas con hidrocarburo. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias UCV. Trabajo Especial de Grado. 89 pp.
- Zamora, A.C., J. Ramos y M. Arias. 2012a. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* 24(1):5-12.
- Zamora, A.C. 2012b. Aspectos ecológicos de comunidades microbianas heterotróficas asociadas a la planicie de inundación del Río Mapire (Edo. Anzoátegui). Postgrado en Ecología, Facultad de Ciencias UCV. Tesis Doctoral. 269 pp.