

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CONSORCIOS MICROBIANOS
ASOCIADOS A LA FORMACIÓN GUADUAS (CUNDINAMARCA, COLOMBIA)**

CLAUDIA MARCELA MAYORGA DÍAZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2012**

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CONSORCIOS MICROBIANOS
ASOCIADOS A LA FORMACIÓN GUADUAS (CUNDINAMARCA, COLOMBIA)**

CLAUDIA MARCELA MAYORGA DÍAZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Bióloga

DIRECTOR:

JORGE LUIS FUENTES LORENZO, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph. D.

CODIRECTOR:

MARIO GARCÍA GONZÁLEZ, GEÓLOGO, M.Sc., Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2012

*A MI FAMILIA
POR SU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por darme la fuerza y el apoyo incondicional para lograr mis propósitos.

Al Doctor Jorge Luis Fuentes Lorenzo por su calidad profesional, dedicación y apoyo durante este proceso.

Al Doctor Mario García González por confiar en nosotros esta investigación.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (Escuela de Biología, UIS), en especial a Indira Mora.

Al Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS) de la Universidad Industrial de Santander por el análisis cromatográfico.

Al Grupo de Investigación en Geología de Hidrocarburos y Carbones (Escuela de Geología, UIS), por el apoyo durante el muestreo.

A Vicerrectoría de Investigación y Extensión, al Laboratorio de Geología de Hidrocarburos y Carbones (Escuela de Geología, UIS), y al Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (Escuela de Biología, UIS), por la financiación de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Zona de muestreo y muestras	25
2.2 Medios de cultivo	27
2.3 Cepas microbianas de referencia	28
2.4 Desarrollo de la colección de los aislados microbianos	29
2.5 Conservación de las estirpes microbianas.....	33
2.6 Ensayos morfológicos, fisiológicos y del metabolismo de la colección de aislados.....	34
2.7 Análisis de grupos metabólicos de la colección de aislados	34
2.8 Ensayos para la producción y determinación de gas metano.....	35
2.9 Confirmación de la presencia de arqueobacterias metanogénicas en los biorreactores mediante la reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos.....	37
3. RESULTADOS	38
3.1 Desarrollo de la colección de aislados microbianos.....	38
3.2 Grupos metabólicos de la colección de aislados	39
3.3 Mantos de carbón productores de gas biogénicos.....	44
3.4 Análisis de la composición de los gases biogénicos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama	50
3.5 Confirmación de la presencia de arqueobacterias metanogénicas en los biorreactores de Manto 11.	53

4.	DISCUSIÓN	55
5.	CONCLUSIONES	62
6.	RECOMENDACIONES	63
	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sobre la conversión de sustratos orgánicos complejos del carbón en gas metano.	21
Figura 2. Zona de estudio en el flanco occidental del Sinclinal de Checua-Lenguazaque.	25
Figura 3. Biorreactor artificial o Canister usado para depositar las muestras de carbón.	27
Figura 4. Metodología de purificación de microorganismos de los mantos de carbón productores de gas biogénico de difícil crecimiento en medio sólido.	33
Figura 5. Esquema de biorreactores usados para producción de gas a partir de muestras de carbón.	36
Figura 6. Grupos metabólicos de la colección de aislados basados en distancias fenotípicas.	40
Figura 7. Producción de gases en medios líquidos (a) y semisólidos (b).	45
Figura 8. Biorreactores en medio M9YAc. A: Manto 18, B: Manto 7- ET, C: Manto 17, D: Manto 12, E: Manto 7- LE, F: Manto 3, G: Manto 11, H: Manto 19, I: Manto 1, J: Manto 5.	46
Figura 9. Biorreactores en medio RCM. A: Manto 5, B: Manto 1, C: Manto 18, D: Manto 7- ET, E: Manto 19, F: Manto 11, G: Manto 3, H: Manto 7- LE, I: Manto 12, J: Manto 17.	47

Figura 10. Crecimiento diferenciado en medio líquido para los aislados del consorcio productor de gases. (1) Metabolismo facultativo. (2 y 4) Metabolismo anaerobio. (3) Metabolismo microaerófilo.....	48
Figura 11. Tipo de colonias producidas en medio semisólido por los aislados del consorcio productor de gases. (a) Forma de discos. (b) Forma de puntos. (c) Forma de motas filamentosas.....	48
Figura 12. Tipos celulares que componen el consorcio productor de gas biogénico del Manto 11. (a) MANTO11-CB-RCM-06, (b) MANTO11-CB-RCM-07, (c) MANTO11-CB-RCM-08, (d) MANTO11-CB-RCM-09, (e) MANTO11-CB-RCM-10, (f) MANTO11-CB-RCM-12 y (g) MANTO11-CB-RCM-13.	49
Figura 13. Biorreactores para la detección de gas en muestras de carbón.	50
Figura 14. Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID). (a) Patrón de gases. (b) Mezcla de gases del biorreactor del Manto 11 a 37°C (c) Mezcla de gases del biorreactor del Manto 11 a 60°C.....	52
Figura 15. Electroforesis correspondiente a las amplificaciones del metagenoma del Manto 11 usando cebadores específicos de arqueobacterias metanogénicas y cebadores universales de bacterias. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: marcador; 1: Control negativo; 2: Manto 11 a 37°C con cebadores universales de bacterias; 3: Manto 11 a 60°C con cebadores universales de bacterias; 4: Control negativo; 5: Manto 11 a 37°C con cebadores específicos de metanógenos; 6: Manto 11 a 60°C con cebadores específicos de metanógenos.	53
Figura 16. Modelo de degradación del carbón bituminoso para la producción de gas biogénico.....	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 2. Estudios de poblaciones microbianas asociadas a diferentes formaciones de mantos de carbón con base en el análisis de secuencias de la subunidad 16S del gen ribosomal.....	24
Tabla 3. Localización de los mantos de carbón estudiados.	26
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo usados.	30
Tabla 5. Pesos de los carbones en los distintos biorreactores.....	32
Tabla 6. Número de aislados microbianos obtenidos a partir de muestras de agua y carbón de los biorreactores correspondientes a cada manto de carbón y medio de cultivo ensayados.	39
Tabla 7. Sub-grupos metabólicos por mantos de carbón.	44
Tabla 8. Producción de gas biogénico a partir de muestras de diferentes mantos de carbón en los medios M9YAc y RCM. Los biorreactores se incubaron por un máximo de 4 semanas a 37°C.....	46
Tabla 9. Tiempos de retención de la mezcla de gases patrón usada en el análisis cromatográfico (GC-FID).	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de la zona de muestreo.....	78
Anexo 2. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de las cepas de referencia.....	102
Anexo 3. Características morfológicas, fisiológicas y del metabolismo de la colección de aislados.....	106
Anexo 4. Propiedades del carbón y potencial de producción de gas metano de los mantos estudiados del sinclinal.	116
Anexo 5. Geoquímica del agua asociada con los mantos de carbón del sinclinal.	117

TITULO: CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CONSORCIOS MICROBIANOS ASOCIADOS A LA FORMACIÓN GUADUAS (CUNDINAMARCA, COLOMBIA) *

AUTOR: Claudia Marcela Mayorga Díaz**

PALABRAS CLAVES: Bacteria, Arqueobacteria, metanogénesis, mantos de carbón, metano, gas biogénico

DESCRIPCIÓN:

En la presente investigación se estudiaron diez mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia), con el fin de caracterizar microbiológicamente los consorcios microbianos y determinar su relación con la producción de gas biogénico. La abundancia microbiana en los mantos de carbón disminuyó de los segmentos superiores a los inferiores y en correspondencia, se presentó un número mayor de subgrupos metabólicos en los mantos superiores y medios respecto a los inferiores. Un análisis de conglomerados basado en descriptores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, agrupó los aislados microbianos obtenidos en dos grupos metabólicamente diferentes (B y C); ambos con subgrupos. Los subgrupos mostraron proximidad metabólica con cepas de referencia representativas de las familias Actinomycetaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Pseudomonadaceae y Streptomycetaceae. El medio de enriquecimiento RCM resultó ser el más indicado para el crecimiento de anaerobios estrictos y productores de gases biogénicos provenientes de los Mantos 11 y 18. Basados en ensayos microbianos *in vitro* combinado con cromatografía de gases, se corroboró la existencia de gas metano en el Manto 11. Un análisis de PCR con cebadores específicos para bacterias y arqueobacterias metanogénicas a partir de metagenomas de los cultivos enriquecidos del Manto 11, mostró la amplificación de bandas de ADN específicas para cada grupo; soportando los resultados de los ensayos *in vitro* validando así el carácter biogénico del metano producido en dicho manto de carbón. Con base en los resultados obtenidos y la información disponible, se propone una ruta de biodegradación de carbón hipotética para el consorcio del Manto 11; donde integrantes de los subgrupos metabólicos (B2, C1, C2) hidrolizarían, solubilizarían y/o despolimerizarían las macromoléculas de carbón, generando intermediarios metabólicos primarios como hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Estos mismos subgrupos, se encargarían de degradar estos intermediarios a metabolitos secundarios como lactato, propionato, H₂, CO₂ y acetato; los cuales, en especial CO₂, son convertidos en metano posiblemente por miembros del subgrupo B1.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.).
Codirector: Mario García González (M.Sc, Ph.D.).

TITLE: MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MICROBIAL CONSORTIA ASSOCIATED WITH THE GUADUAS FORMATION (CUNDINAMARCA, COLOMBIA) *

AUTHOR: Claudia Marcela Mayorga Díaz**

KEY WORDS: Bacteria, Archaea, methanogenesis, coal bed, methane, biogenic gas

DESCRIPTION:

In the present investigation ten coalbeds of the Checua-Lenguazaque syncline (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia), were studied for microbiological characterization of cultivable microbial consortia and for determining their relationship with the production of biogenic gas. Microbial abundance in the coal beds decreased from the upper to the lower seam. It was shown a greater number of metabolic subgroups in the upper and middle seams than in the lower. A cluster analysis based on morphological, physiological and biochemical characters clustered microbial isolates in two different metabolic groups (B and C). The subgroups were metabolically related to Pseudomonadaceae, Actinomycetaceae, Clostridiaceae, Bacillaceae and Streptomyetaceae families. Enriched medium RCM was suitable for the cultivation of strict anaerobes and production of biogenic gases from the coalbeds 11 and 18 (Manto 11 and 18). Based on *in vitro* tests and gas chromatography, methane biogenic gas in the coalbed 11 was confirmed. A PCR reaction using specific primers for Bacteria, Archaea from metagenome of enrichment cultures from "Manto 11" coalbed showed specific bands amplification for both groups, supporting *in vitro* assays and the biogenic nature of coalbed gases. We propose a hypothetical mechanism for coal degradation for the consortia of the Manto 11, in which bacteria of the metabolic subgroups (B2, C1, and C2) could hydrolyze, solubilize and/or depolymerize the coal macromolecule, for generating primary metabolic intermediates as aliphatic and aromatic hydrocarbons. These same subgroups could be responsible for degrading those intermediaries to secondary metabolites such as lactate, propionate, H₂, CO₂ and acetate. Finally, these would be the substrates for methane generation, especially CO₂ by the subgroup B1.

* Investigation

** Faculty of Science. Program of Biology. Advisor: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.).
Co-advisor: Mario García González (M.Sc, Ph.D.).

INTRODUCCIÓN

Existe un creciente interés por la explotación de fuentes no convencionales de gas que permitan incrementar la generación de este recurso para compensar su creciente demanda energética. En Colombia, las reservas de gas metano son actualmente de 17.5×10^{12} pies cúbicos de gas (17.5 TCF) y su consumo de 7×10^9 pies cúbicos por día. Se estima que con el ritmo de consumo actual, estas reservas de gas se agotarán en los próximos 10 años (García-González, 2010).

Una de estas fuentes no convencionales de gas son los reservorios de gas metano asociado a formaciones geológicas con mantos de carbón (Longwell et al. 1995; Scott et al. 1995; Beaton et al. 2006). Por ejemplo, la producción de gas metano asociado a mantos de carbón en los Estados Unidos representa el 10% del total de consumo anual (equivalente a 1.5 TFC por año). Recientemente, mediante un estudio de la composición isotópica (^{13}C y ^1D) del carbón (Martínez, 2009), se evidenció el origen biogénico de algunos de los reservorios de gas metano en las formaciones de Cerrejón y Cucunubá en Colombia. Lo anterior indica, que el potencial de tales tecnologías para incrementar los volúmenes de producción de gas metano en Colombia son altamente promisorias, si se considera que el país posee las mayores reservas de carbón en Suramérica.

El desarrollo de biotecnologías dirigidas a incrementar la producción de gas metano a partir de carbón, cobran cada día mayor importancia dado que estas pueden convertirse en fuentes alternativas renovables de este hidrocarburo (Polman et al. 1995; Flores, 2008; Elshahed, 2010; Wang et al. 2010). Scott et al. (1994), fueron los primeros que introdujeron el concepto de metano de mantos de carbón incrementado microbiológicamente, donde propusieron la inyección de consorcios bacterianos y nutrientes en los mantos de carbón, con el fin de incrementar la cantidad de metano en el manto y facilitar su extracción. Otros

investigadores plantean que la inyección de nutrientes que estimulen la actividad de producción de metano de los microorganismos nativos del manto de carbón, puede ser más efectiva que la introducción de nuevas estirpes microbianas (Wang et al. 2010). Bajo condiciones de laboratorio, se ha demostrado que se puede producir metano usando consorcios microbianos y carbón de diferente origen (Johnson et al. 1994; Gupta y Birendra, 2000; Green et al. 2008; Harris et al. 2008; Jones et al. 2008); soportando además la factibilidad de tecnologías *ex situ* para la producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial. En este contexto, es esencial el conocimiento sobre los consorcios microbianos involucrados en la producción de gas metano en mantos de carbón. Dichos estudios permiten una mejor comprensión de los procesos de generación de gas biogénico en el subsuelo y por tanto, vislumbrar nuevas tecnologías más eficientes para la producción de gas metano a partir de carbón.

Existen algunos estudios sobre la composición de las poblaciones microbianas asociados con mantos de carbón (Ward et al. 2004; Shimizu et al. 2007; Strapoć et al. 2007; Green et al. 2008; Klein et al. 2008; Li et al. 2008; Fry et al. 2009; Midgley et al. 2010; Penner et al. 2010; Guo et al. 2012; Tang et al. 2012) mostrando que las clases de metanógenos mayormente representadas son: Methanomicrobia, Methanobacteria y Methanococci; mientras que los grupos bacterianos del consorcio microbiano productor de gas son representantes de los Phylum Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Spirochaetes. Sin embargo, poco se conoce sobre los tipos metabólicos responsables de la producción de gas en los consorcios microbianos (Shimizu et al. 2007; Green et al. 2008; Penner et al. 2010).

En el presente estudio, se plantearon como objetivos caracterizar microbiológicamente los consorcios microbianos cultivables que habitan los mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia), así como, determinar su relación con la producción de gas biogénico

en dichos mantos. Combinando las técnicas de enriquecimiento microbiano, cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, el presente estudio permitió conocer los diferentes grupos metabólicos que conforman los consorcios microbianos involucrados en la producción de gas metano en el Sinclinal Checua-Lenguazaque; así como, postular un modelo que explique las rutas principales de biodegradación que conducen a la producción de metano en los mantos de carbón.

1. MARCO TEÓRICO

El gas metano asociado a mantos de carbón puede categorizarse en dos tipos principales: gas termogénico y gas biogénico (Tabla 1). El primero se forma durante el proceso de carbonificación de la materia orgánica (turba) y es consecuencia de las altas presiones y temperaturas que caracterizan estos procesos primarios de formación del carbón. El gas biogénico se sub-divide en dos tipos principales: gas primario y gas secundario. El primero, es generado por actividad microbiana en las primeras fases de formación del carbón a partir de la materia orgánica contenida en él. El segundo, es consecuencia también de la actividad microbiana, pero ocurre a partir de la actividad metabólica de los microorganismos introducidos desde aguas meteóricas y/o subterráneas, que se filtran en los mantos de carbón, o por rocas permeables adyacentes ricas en materia orgánica (Scott et al. 1994).

El conocimiento sobre los mecanismos de generación de gas metano en mantos de carbón abre nuevos horizontes para el desarrollo de tecnologías de producción de gas metano con base en biotecnologías (Flores, 2008; Wang et al. 2010). Scott et al. (1994), fueron los primeros en introducir el concepto de metano de mantos de carbón microbiológicamente incrementado, proponiendo la inyección de consorcios bacterianos y nutrientes en los mantos de carbón, con el fin de incrementar la cantidad de metano en el manto y facilitar su extracción. Otros investigadores plantean que la inyección de nutrientes para estimular la actividad de producción de metano de los microorganismos nativos de mantos de carbón, puede ser más efectiva que la introducción de nuevas estirpes microbianas (Wang et al. 2010). Bajo condiciones de laboratorio, se ha demostrado que se puede producir metano usando consorcios microbianos y carbón de diferente origen (Volkwein et al. 1994; Johnson et al. 1994; Gupta y Birendra, 2000; Green et al. 2008; Harris et al. 2008; Jones et al. 2008; Orem et al. 2010; Opara et al. 2012);

soportando además la factibilidad de tecnologías *ex situ* para la producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial.

Tabla 1. Principales formaciones geológicas estudiadas por su potencial para la producción de gas metano asociado a mantos de carbón. Se indica el origen mayoritario del gas metano producido.

Formación geológica	Origen del gas metano	Referencia
Cuenca San Juan (Colorado - Nuevo México, USA)	Mayormente termogénico	Scott et al. (1994) Johnson y Flores (1998)
Cuenca Rio Polvo (Montana-Wyoming, USA)	Mayormente biogénico	Formolo et al. (2008) Flores et al. (2008) Formolo et al. (2008) Rice et al. (2008) Ulrich y Bower (2008)
Cuenca Sureste Illinois (Illinois-Indiana-Kentucky, USA)	Mayormente biogénico (Indiana) Mayormente termogénico (Kentucky)	Strapoć et al. (2007) Solano-Acosta et al. (2008)
Cuenca Cook Inlet – Valle Matanuska (Alaska, USA)	Mayormente biogénico	Johnson y Flores (1998) Barker y Dallegge (2006)
Cuenca del Golfo de México (Lousiana-Mississippi, USA)	Mayormente biogénico	Warwick et al. (2008)
Valle del Rio Elk (Sureste Columbia Británica, Canada)	Mayormente biogénico	Aravena et al. (2003)
Formación Mannville (Llanos de Alberta, Canada)	Mayormente termogénico (Mannville)	Beaton et al. (2006)
Cañon Herradura/Rio Belly (Llanos de Alberta, Canada)	Mayormente biogénico (Herradura/Belly)	Cheung et al. (2009) Cheung et al. (2010)
Cuencas Bowen, Sydney y Surat (Australia)	Mayormente biogénico	Smith y Pallasser (1996) Ahmed y Smith (2001) Faiz y Hendry (2006) Kinnon et al. (2010)
Formaciones Huntly, Ohai y Greymouth (Nueva Zelandia)	Mayormente biogénico	Butland y Moore (2008) Mares y Moore (2008)
Formaciones Xinji, Lyazhuang y Enhong (China)	Mayormente biogénico	Tao et al. (2005)
Cuenca Ordos (China)	Mayormente termogénico	Guoyi et al. (2010)
Cuenca Witwatersrand (Sur Africa)	Mayormente biogénico	Ward et al. (2004)
Cuencas Silesian y Lublin (Polonia)	Mayormente biogénico	Kotarba y Rice (2001)
Cuenca Zonguldak (Mar Negro Occidental, Turkia)	Mezcla termogénico/biogénico	Hoşgörmez et al. (2002)

Lo que se conoce como carbón mineral, es un sistema complejo compuesto de materia orgánica (85-95%) y materiales inorgánicos como aluminosilicatos y piritas que constituyen el peso restante del carbón (Levine et al. 1982). La materia orgánica refleja la naturaleza del material vegetal precursor que puede incluir compuestos fermentados por bacterias como son: ligninas, ácidos grasos,

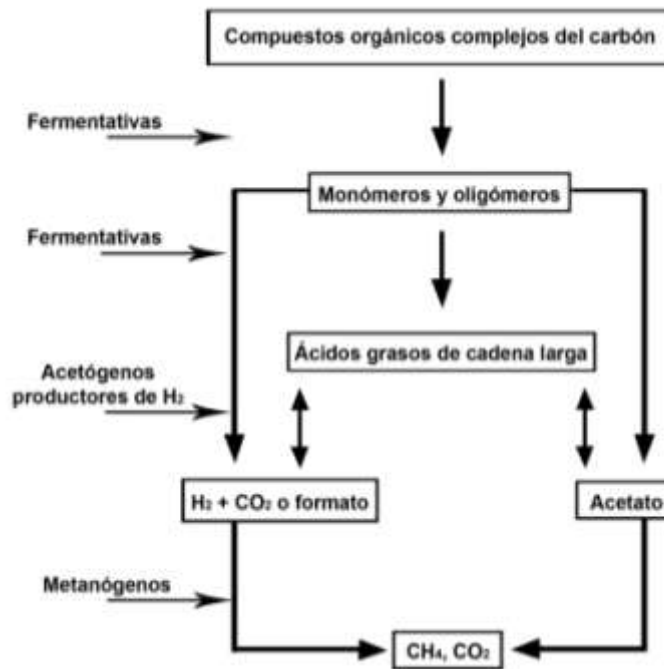
alcoholes, cetonas, n-alcanos, isoprenoides, compuestos aromáticos y alifáticos (Catcheside y Ralph, 1999; Ahmed y Smith, 2001; Formolo et al. 2008). En tal sentido, un manto de carbón constituye, por su composición, un adecuado microambiente para el desarrollo de consorcios microbianos.

Existen dos procesos principales por los cuales los microorganismos producen metano en las formaciones de carbón. Estos son: 1) reducción del dióxido de carbono ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$), y 2) fermentaciones dependientes de metilos ($\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$); siendo el primero el mecanismo más frecuente (Smith y Pallasser, 1996; Ward et al. 2004; Faiz y Hendry, 2006; Strapoć et al. 2007; Butland y Moore, 2008; Flores et al. 2008; Rice et al. 2008; Warwick et al. 2008; Kinnon et al. 2010). Sin embargo, estudios en algunas formaciones geológicas con mantos de carbón han mostrado que las fermentaciones conducentes a acetato también son críticas para la producción de metano (Barker y Dallegge, 2006; Flores et al. 2008; Ulrich y Bower, 2008; Cheung et al. 2010); lo cual ha sido evidenciado bajo condiciones de laboratorio (Orem et al. 2010).

Para convertir los sustratos orgánicos complejos presentes en el carbón en metano se requiere, además de las arqueobacterias metanogénicas, otras bacterias del tipo fermentativas y acetogénicas (Figura 1). Las bacterias fermentativas deben hidrolizar y fermentar los sustratos produciendo acetato, cadenas largas de ácidos grasos, CO_2 , H_2 , NH_4^+ y HS^- . Las bacterias acetogénicas pueden consumir H_2 y CO_2 , dimetoxilar material de bajo peso molecular, o hidrolizar compuestos aromáticos, para producir acetato. Otras bacterias acetogénicas productoras de H_2 , pueden convertir ácidos grasos, alcoholes y algunos compuestos aromáticos y aminoácidos, en H_2 , CO_2 y acetato. Se ha indicado, que los principales compuestos del carbón degradados por actividad microbiana hasta acetato son n-alcanos, isoprenoides e hidrocarburos policíclicos y alifáticos. La actividad de los metanógenos (Arqueobacterias) constituye la última pero más importante etapa del proceso, donde H_2 , CO_2 , formato y acetato,

son usados para producir metano (Formolo et al. 2008; Strapoć et al. 2007; Warwick et al. 2008; Orem et al. 2010; Wang et al. 2010).

Figura 1. Esquema sobre la conversión de sustratos orgánicos complejos del carbón en gas metano.



Modificado de Wang et al. 2010.

Se conoce además que existen dos mecanismos que podrían ayudar a la modificación estructural del carbón como la solubilización y la despolimerización. El primero, es un proceso no enzimático que involucra excreción de metabolitos alcalinos de bajo peso molecular; los cuales solubilizan el carbón a pH entre 7 y 10 (Crawford y Gupta, 1991; Hofrichter y Fakoussa, 2001). El segundo, es un proceso enzimático que ocurre a pH ácidos entre 3 y 6. Este resulta en el clivaje de enlaces dentro de la molécula de carbón permitiendo la formación de sustancias ácidas de bajo peso molecular (Hofrichter y Fakoussa, 2001).

La producción de gas metano en los mantos de carbón está influenciada por diferentes factores como son: 1) la historia geológica regional (ej: actividad tectónica e hidrotermal, grado de carbonificación de la materia orgánica (turba), erosión, permeabilidad del manto), 2) la hidrogeología (ej: infiltración de agua meteórica, formación de agua) y, 3) la microbiología (ej: composición y capacidad metabólica de la comunidad microbiana, área superficial de carbón expuesta al microorganismo, solubilidad, y tipo de sustrato orgánico presente en el carbón, acidez), entre otros (Scott et al. 1994; Bodden y Ehrlich, 1998; Johnson y Flores, 1998; Ahmed y Smith, 2001; Bell, 2006; Strapoć et al. 2007; Formolo et al. 2008; Harris et al. 2008; Jones et al. 2008; Mares y Moore, 2008; Rice et al. 2008).

Para la diferenciación de los gases producidos en mantos de carbón (termogénico o biogénico), se usa la medición de la composición y proporción de isótopos estables. Frecuentemente, se utilizan parámetros como el ratio de metano respecto a la suma de etano y propano ($C_1/(C_2+C_3)$), la composición isotópica del hidrógeno y carbono del metano (δ^1D y $\delta^{13}C$) y, la diferencia isotópica entre CO_2 y metano ($\Delta\delta^{13}C_{(CO_2-CH_4)}$). Los gases termogénicos tienden a tener valores de $\delta^{13}C > -5.5\%$ y $\delta^1D > -25\%$, mientras que los valores de $\delta^{13}C$ del gas biogénico son usualmente considerados menores a -5.5% . Sin embargo, estos rangos varían entre los diferentes estudios, en especial el límite máximo de $\delta^{13}C$, por lo que es un tema en discusión (Wang et al. 2010).

Recientemente se ha indicado que la composición de isótopos de hidrógeno y carbono del metano (δ^1D y $\delta^{13}C$) es diferente según el origen del metano biogénico (reducción de CO_2 o fermentación de metilos) (Wang et al. 2010). Se ha comprobado, que el metano resultante de la reducción de CO_2 es pobre en $\delta^{13}C$ mientras que el resultante de la fermentación de metilos es enriquecido en $\delta^{13}C$ (Rice, 1993). Según Flores et al. (2008) el uso de los isótopos δ^1D y $\delta^{13}C$ es un buen primer acercamiento para la evaluación del origen de metano en mantos de carbón. Sin embargo, la oxidación de metano por bacterias anaerobias y/o

aerobias selectivamente remueve ^{12}C , cambiando los valores de $\delta^{13}\text{C}$ hacia valores más positivos (Scott et al. 1994; Flores et al. 2008). Esto se traduce en valores que se asemejan a los de metano de origen termogénico (Scott et al. 1994).

Por su parte, Wang et al. (2010) plantean que el metano biogénico producido por la reducción de CO_2 es enriquecido en deuterio en comparación con el originado por la vía de fermentación de metilos. Esto se debe a que el 25% del hidrógeno del metano generado en la fermentación de metilos es derivado del agua producida (Scott et al. 1994; Flores et al. 2008; Wang et al. 2010) y el 75% de los grupos metilos (Flores et al. 2008; Wang et al. 2010); mientras que el hidrógeno del metano producido por la reducción de CO_2 es 100% derivado de la formación de agua (Scott et al. 1994; Flores et al. 2008; Wang et al. 2010).

Existe un limitado número de estudios sobre la composición y diversidad de los consorcios microbianos asociados con mantos de carbón (Ward et al. 2004; Shimizu et al. 2007; Strapoc et al. 2007; Green et al. 2008; Klein et al. 2008; Li et al. 2008; Fry et al. 2009; Midgley et al. 2010; Penner et al. 2010; Guo et al. 2012; Tang et al. 2012). Los resultados mostraron diferencias en la composición de los consorcios microbianos de las formaciones geológicas estudiadas, pero son muy frecuentes los representantes bacterianos de las cinco clases de Proteobacteria (Alpha, Beta, Delta, Gamma y Épsilon), así como, de las clases Clostridia, Actinobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Flavobacteria, Acidobacteria, Bacilli, Mollicutes, Negativicutes y Fibrobacteres. Las clases de Archeobacteria mayormente representadas fueron: Methanomicrobia, Methanobacteria y Methanococci. Todos los estudios indicados en la Tabla 2, con una sola excepción (Li et al. 2008), evidenciaron la presencia de representantes de las clases metanogénicas de Archeobacteria. Sin embargo, en las poblaciones estudiadas, estas clases metanogénicas se encontraron siempre en menor proporción que las clases bacterianas con metabolismo anaerobio fermentativo, indicando la

importancia del conocimiento sobre la composición de los consorcios microbianos de estos microambientes para una mejor comprensión del proceso de producción de metano.

Tabla 2. Estudios de poblaciones microbianas asociadas a diferentes formaciones de mantos de carbón con base en el análisis de secuencias de la subunidad 16S del gen ribosomal.

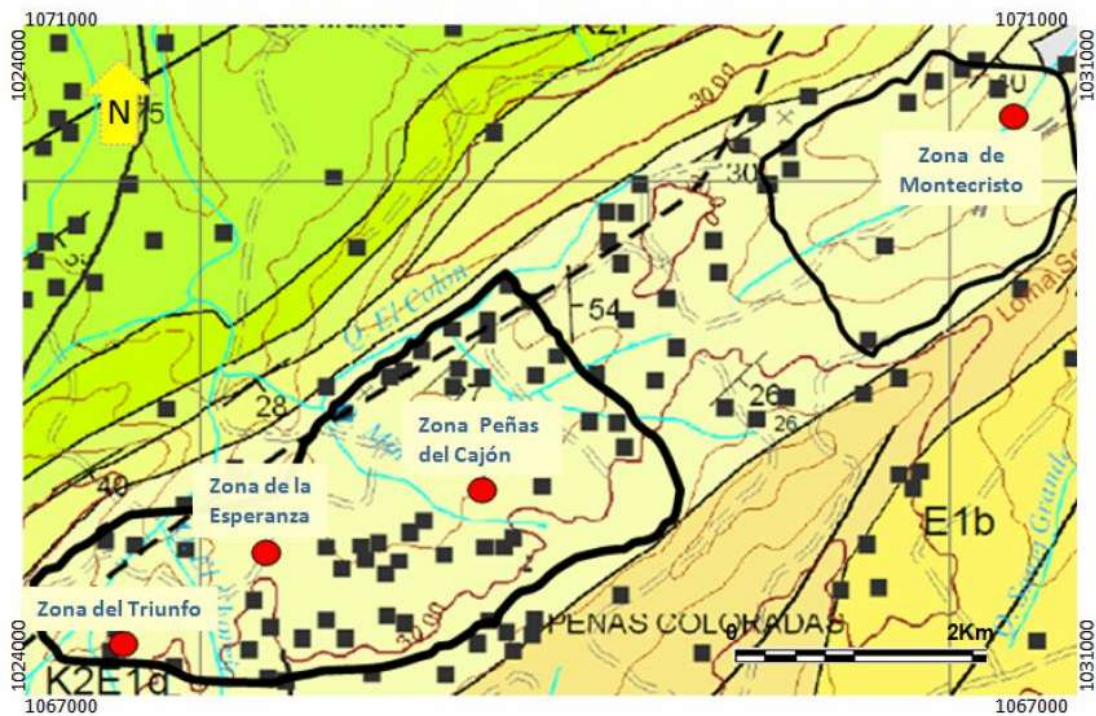
Formación geológica	Taxa (clase) microbiana	Referencia
Cuenca Rio Polvo (Montana-Wyoming, USA)	Bacteria: Clostridia, Mollicutes, Spirochaetes, Deltaproteobacteria Archaea: Methanomicrobia, Methanobacteria, Methanococci	Green et al. (2008) Klein et al. (2008)
Cuenca Sureste Illinois (Illinois-Indiana-Kentucky, USA)	Bacteria: Clostridia, Alphaproteobacteria, Flavobacteria, Spirochaetes, Negativicutes Archaea: Methanomicrobia	Strapoć et al. (2007)
Llanos de Alberta, (Alberta, Canada)	Bacteria: Clostridia, Bacilli, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria Archaea: Methanomicrobia, Methanobacteria	Penner et al.(2010)
Cuencas Bowen, Sydney y Surat (Australia)	Bacteria: Clostridia, Bacilli, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Flavobacteria Archaea: Thermoprotei, Archaeoglobi, Halobacteria, Thermococci	Li et al. (2008)
Cuenca Witwatersrand (Sur Africa) Formación Ishikari (Hokkaido, Japón)	Archaea: Methanomicrobia Bacteria: Clostridia, Alphaproteobacteriam, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria Archaea: Methanomicrobia, Methanobacteria	Ward et al. (2004) Shimizu et al. (2007)
Región carbonífera Waikato (Nueva Zelanda)	Bacteria: Alphaproteobacteriam, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria Actinobacteria, Bacilli, Clostridia, Bacteroidetes Archaea: Methanomicrobia, Methanobacteria, Thermococci	Fry et al. (2009)
Distrito Liulin del Este de la Cuenca de Ordos (China)	Bacteria: Alphaproteobacteriam, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria Actinobacteria, Clostridia, Bacteroidetes, Spirochaetes Archaea: Methanomicrobia, Methanobacteria	Guo et al. (2012)
Cuenca de Ordos (China)	Bacteria: Alphaproteobacteriam, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria Actinobacteria, Bacilli, Bacteroidetes, Planctomycetes, Acidobacteria Archaea: Methanomicrobia,	Tang et al. (2012)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Zona de muestreo y muestras

El área de estudio se encuentra en el flanco occidental del Sinclinal Checua-Lenguazaque, localizado en el municipio Cucunubá, Cundinamarca, Colombia (Figura 2); la cual ha sido estudiada para la presencia de gas en los diferentes mantos de carbón de la Formación Guaduas (García-González, 2010).

Figura 2. Zona de estudio en el flanco occidental del Sinclinal de Checua-Lenguazaque.



Tomado de Araque-Nuñez y García-González, 2011.

Las muestras de carbón fueron tomadas específicamente de mantos carboníferos correspondientes a diferentes secciones (El Triunfo, La Esperanza, Peñas del Cajón y Montecristo) relacionadas con los segmentos superiores, medios e inferiores del sinclinal, cuyas coordenadas se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Localización de los mantos de carbón estudiados.

Mantos por segmento	Mantos	Coordenadas			Zonas por sección	Profundidad de extracción (m)	Espesor acumulado (m)
		X	Y	Z			
Segmento ocho (mantos superiores)	Manto 19	1027409	1068046	2947	Peñas del Cajón	500	373
	Manto 18	1030698	1070461	2702	Montecristo	250	350
	Manto 17	1030663	1070421	2711		88	337
Segmento cinco (mantos medios)	Manto 12	1025270	1067623	2876	La Esperanza	460	163
	Manto 11	1026281	1068006	2889		507	154
	Manto 7- LE	1026134	1067976	2873		230	117
	Manto 7- ET	1025253	1067642	2872	El Triunfo	200	117
	Manto 5	1024072	1067053	2968		450	98
Segmento uno (mantos inferiores)	Manto 3	1024829	1067655	2882	El Triunfo	500	44
Manto 1	1024657	1067531	2863	400		22	

Tomado de Araque-Nuñez y García-González, 2011

Las muestras de carbón colectadas de cada manto (~ 2 Kg), fueron colocadas en biorreactores artificiales o Canisters estériles (Figura 3) y cubiertas con agua estéril hasta el borde del biorreactor. Cada biorreactor (uno por cada manto) se selló herméticamente y se mantuvo durante 3 meses bajo condiciones de anaerobiosis, simulando aquellas bajo las cuales se produce naturalmente gas metano en los mantos de carbón (anegamiento, anaerobiosis, etc.). Al término de 3 meses, cada biorreactor se ensayó para determinar el tipo de gas metano (termogénico o biogénico) liberado en el mismo, siguiendo los estándares

establecido a tales fines por el Laboratorio de Hidrocarburos y Carbones de la Universidad Industrial de Santander (ver Araque-Nuñez y García-González, 2011). Luego del análisis de gases, muestras de agua y carbón de cada bioreactor se conservaron a una temperatura de 2-8°C en frascos plásticos estériles (1 L) sellados con parafilm, para su posterior análisis microbiológico en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander.

Figura 3. Biorreactor artificial o Canister usado para depositar las muestras de carbón.



Tomado de Araque-Nuñez y García-González, 2011.

2.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo y suplementos usados tanto para el aislamiento como para la identificación de grupos metabólicos, fueron obtenidos de las casas comerciales CRYOGAS (Bogotá, Colombia), J.T. BAKER (Nueva Jersey, USA), MERCK S.A.

(Darmstadt, Alemania), OXOID LTD (Basingstoke, Inglaterra), Becton Dickinson & Company (Nueva Jersey, USA), y SIGMA-ALDRICH (St. Louis, Estados Unidos), o preparados en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (Escuela de Biología-UIS), siguiendo las indicaciones descritas en la fuente correspondiente. Para el aislamiento de microorganismos se emplearon los siguientes medios y fuentes de carbono: medio mínimo de sales M9 (SIGMA-ALDRICH), medio RCM (de sus siglas en inglés Reinforced Clostridial Medium, (OXOID), acetato de sodio (J.T. BAKER), CO₂ (CRYOGAS), etanol (J.T. BAKER), glicerol (J.T. BAKER), glucosa (SIGMA-ALDRICH), isopropanol (MERCK) y metanol (MERCK). Los medios usados durante las pruebas de identificación de grupos metabólicos fueron los siguientes: Citrato Simmons agar (MERCK), DNasa agar (MERCK), Gelatina agar (MERCK), Lactosa caldo (OXOID), Levine Eosina Azul de Metileno agar (MERCK), MacConkey agar (MERCK), Manitol Salado agar (OXOID), Nutriente agar (MERCK), Nutriente caldo (MERCK), Rojo de Metilo-Voges Proskauer caldo (OXOID), SIM agar (MERCK), BBL™ Urea agar base (Becton Dickinson & Company). La composición y forma de preparación de los medios de cultivo mencionados son descritas en el manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología, UIS.

2.3 Cepas microbianas de referencia

Las estirpes bacterianas certificadas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de sus siglas en inglés) se obtuvieron de la casa comercial OXOID LTD (Basingstoke, Inglaterra), y fueron usadas como cepas de referencia durante la identificación de los grupos metabólicos de los aislados bacterianos. Estas son las siguientes: *Actinomyces viscosus* ATCC®15987™, *Bacillus cereus* ATCC®10876™, *Bacillus licheniformis* ATCC®12759™, *Bacillus megaterium* ATCC®9885™, *Bacillus sphaericus* ATCC®4525™, *Bacillus subtilis* ATCC®6633™, *Citrobacter braakii* ATCC®43162™, *Clostridium bifermentans* ATCC®10137™,

Enterobacter aerogenes ATCC®35029™, *Escherichia coli* (JM101) ATCC®33876™, *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* ATCC®10149™, *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* ATCC®43865™, *Proteus vulgaris* ATCC®33420™, *Providencia alcalifaciens* ATCC®51902™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®10145™, *Pseudomonas fluorescens* ATCC®13525™, *Salmonella enterica* (subsp. *enterica* serovar *typhimurium*) ATCC®13331™, *Staphylococcus aureus* (subsp. *aureus*) ATCC®33592™, *Streptococcus mutans* ATCC®25175™, *Streptomyces griseus* (subsp. *griseus*) ATCC®10137™ (Anexo 2). La cepa *Escherichia coli* PQ37 se utilizó como control positivo en la prueba de la β -galactosidasa.

2.4 Desarrollo de la colección de los aislados microbianos

Para el aislamiento de microorganismos que forman parte de los consorcios que habitan en los mantos de carbón, se diseñaron diferentes medios de enriquecimiento teniendo en consideración la información disponible sobre el metabolismo de este tipo de consorcio, la cual fue resumida en la Figura 1. Con el fin de maximizar el crecimiento de grupos aerobios o facultativos, ya fueran autótrofos o heterótrofos, se consideraron diferentes variantes del medio mínimo de sales M9 suplementado con una fuente de vitaminas (extracto de levadura) y diferentes fuentes de carbono como: acetato de sodio, CO₂, etanol, glicerol, glucosa, isopropanol y metanol (Tabla 4). Con el fin de maximizar el crecimiento de microorganismos anaeróbicos se usó el medio de enriquecimiento RCM recomendado para tal fin. En todos los casos, los medios líquidos de enriquecimiento fueron desoxigenados mediante gasificación con CO₂ (carbonatados) con el fin de favorecer las condiciones de anaerobiosis.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo usados.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN (1L)
M9	Fosfato disódico 33.9g; fosfato monopotásico 15g; cloruro de sodio 2.5g; cloruro de amonio 5g; rojo fenol 0.018g, pH: 7.4 ± 0.2
M9Y	Como M9 + extracto de levadura 1g
M9YGlu	Como M9Y + D- (+) glucosa 10g
M9YAc	Como M9Y + acetato de sodio 10g
M9YGly	Como M9Y + glicerol 10MI
M9YEt	Como M9Y + etanol 10MI
M9YMet	Como M9Y + metanol 10mL
M9YPro	Como M9Y + isopropanol 10MI
RCM	Extracto de carne 10g; peptona 10g; extracto de levadura 3g; almidón soluble 1g; glucosa monohidratada 5g; clorhidrato de cisteína 0.5g; cloruro de sodio 5g; acetato de sodio 3g; rojo fenol 0.018g, pH: 6.8 ± 0.2

M9: medio mínimo de sales M9 5X; **M9Y:** medio mínimo de sales M9 + extracto de levadura; **Glu:** Glucosa; **Ac:** Acetato de sodio; **Gly:** Glicerol; **Et:** Etanol; **Met:** metanol; **Pro:** isopropanol; **RCM:** Reinforced Clostridial medium.

2.4.1. Aislamiento de microorganismos a partir del agua de los biorreactores

El aislamiento de microorganismos aerobios o facultativos a partir de muestras de agua de los biorreactores, se llevó a cabo mediante diluciones seriadas sembradas en cultivos de enriquecimiento (Tabla 4) y posterior siembra superficial en cajas de Petri conteniendo el mismo medio de cultivo. El procedimiento desarrollado fue el siguiente: las muestras de agua (1 mL de la dilución) se inocularon en tubos de ensayo (20 mL) con los medios mencionados en la Tabla 4 y se dejaron crecer sin agitación entre 4 y 8 días a 37°C. A partir de los cultivos crecidos, se desarrollaron diluciones seriadas (0.1 mL de cultivo) en 0.9 mL de

Buffer Fosfato (0.1M) suplementado con 1% de Octil Fenol Etoxilato; las cuales fueron sembradas en cajas de Petri con el respectivo medio para la obtención de colonias aisladas. Los microorganismos con metabolismo aerobio (o facultativo), crecieron en una incubadora microbiológica convencional a una temperatura de 37°C durante 12-24 horas.

El aislamiento de microorganismos anaeróbicos a partir de muestras de agua de los biorreactores, se llevó a cabo mediante diluciones seriadas sembradas en medio RCM. El procedimiento desarrollado fue el siguiente: las muestras de agua (1 mL) se inocularon en tubos de ensayo (20 mL) con el medio RCM carbonatado y se dejaron crecer sin agitación entre 4 y 8 días a 37°C dentro de un Sistema OXOID generador de anaerobiosis (OXOID Ltd, Cambridge, Reino Unido). A partir de los cultivos crecidos, se desarrollaron diluciones seriadas mezclando 1 mL del cultivo con 9 mL de medio RCM semisólido (6g/L de agar) y se seleccionaron colonias en las mayores diluciones donde esto fue posible. Las colonias seleccionadas se sembraron en medio líquido RCM y luego se replicaron en cajas Petri para la selección de colonias puras. Las condiciones de crecimiento anaeróbico en todos los casos se generaron usando el sistema indicado anteriormente.

2.4.2. Aislamiento de microorganismos a partir del carbón de los biorreactores

El aislamiento de microorganismos mesófilos anaeróbicos a partir de muestras de carbón de los biorreactores, se llevó a cabo en los medios carbonatados M9YAc y RCM usando una variante del método del número más probable. El procedimiento desarrollado fue el siguiente: aproximadamente $0.5g \pm 0.2$ (Tabla 5) de carbón en trozos de cada manto, fueron sumergidos en etanol al 70% durante 20 minutos, secados y triturados en morteros estériles, y agregados en tubos Pirex

conteniendo 20 mL de los medios mencionados y tubos Durham invertidos que permitieron capturar los gases producidos. Los tubos Pirex fueron sellados con papel parafilm e incubados por 30 días a una temperatura de 37°C, bajo las condiciones de crecimiento anaerobio mencionadas anteriormente.

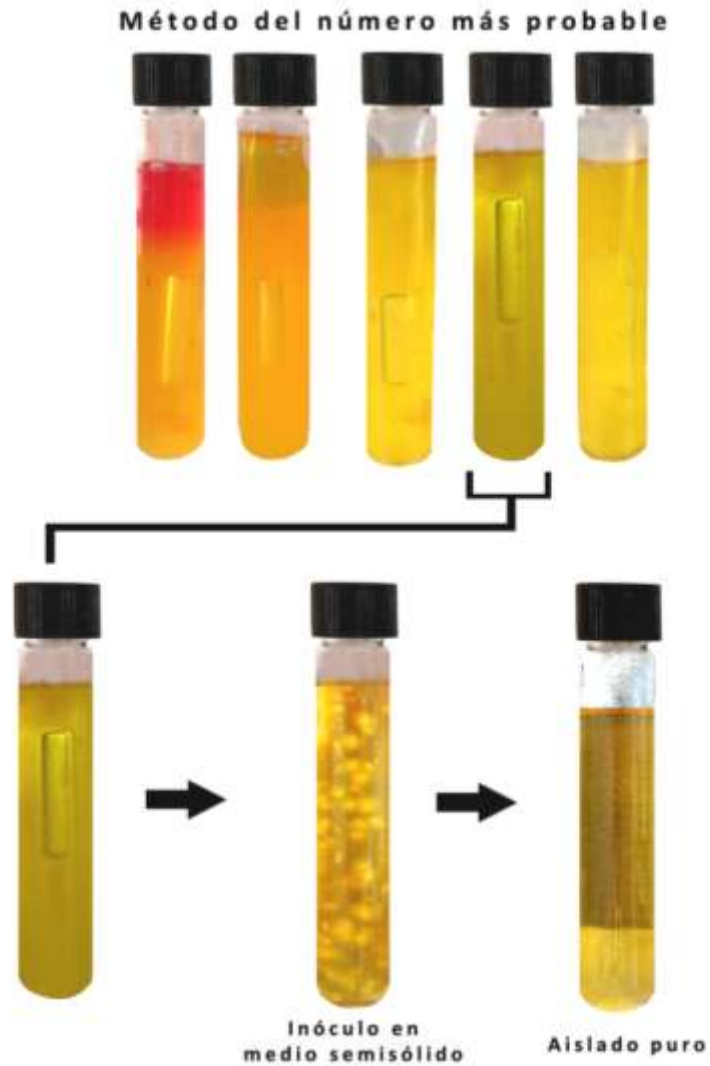
Tabla 5. Pesos de los carbones en los distintos biorreactores.

MUESTRA	RCM			M9YAc		
	1 réplica	2 réplica	3 réplica	1 réplica	2 réplica	3 réplica
Manto 5	0.637	0.587	0.471	0.62	0.655	0.567
Manto 1	0.489	0.444	0.456	0.506	0.486	0.645
Manto 18	0.555	0.605	0.594	0.598	0.558	0.456
Manto 7- ET	0.558	0.474	0.525	0.586	0.443	0.534
Manto 19	0.573	0.495	0.603	0.548	0.49	0.52
Manto 11	0.53	0.321	0.396	0.524	0.401	0.389
Manto 3	0.375	0.357	0.621	0.353	0.405	0.569
Manto 7- LE	0.488	0.358	0.479	0.514	0.429	0.476
Manto 12	0.571	0.599	0.484	0.629	0.524	0.601
Manto 17	0.700	0.442	0.58	0.674	0.424	0.598

RCM: Reinforced Clostridial medium; **M9YAc:** medio mínimo de sales M9 + extracto de levadura + acetato de sodio

Aquellos tubos que mostraron producción de gas, se usaron para aislar los microorganismos que conformaron consorcios productores de gases. Para ello, se desarrollaron diluciones seriadas de los cultivos (0.1 mL) en Buffer Fosfato (0.1M) suplementado con 1% de Octil Fenol Etoxilato, las cuales fueron sembradas en medio fresco. El cultivo correspondiente a la dilución más alta que mostró producción de gas, fue usado para preparar nuevas diluciones que se sembraron en el mismo medio semisólido (6g/L de agar) donde eventualmente se seleccionaron colonias puras (Figura 4). El criterio de pureza fue la homogeneidad de forma en una tinción de Gram. Durante el proceso de purificación de los microorganismos, los cultivos fueron incubados a 37°C, y eventualmente a 60°C, durante 24-72 horas bajo las condiciones de anaerobiosis ya mencionadas.

Figura 4. Metodología de purificación de microorganismos de los mantos de carbón productores de gas biogénico de difícil crecimiento en medio sólido.



2.5 Conservación de las estirpes microbianas

Para conservar la colección microbiana, los aislados fueron sembrados en 2 mL del mismo medio donde estos fueron aislados (Tabla 4), y se dejaron crecer

durante 12 horas a 37°C. La pureza de cada cultivo se comprobó mediante una tinción de Gram, y posteriormente se mezclaron en un tubo estéril 1.4 mL del cultivo con 0.6 mL de glicerol para una concentración final de glicerol en el medio del 30%. Se mezcló bien el cultivo y se distribuyeron 300 µl de la mezcla en Crioviales que contenían 0.5 mg de Zeolita previamente esterilizados. Los aislados conservados fueron almacenados a -80°C.

2.6 Ensayos morfológicos, fisiológicos y del metabolismo de la colección de aislados

Se estudiaron un total de 44 descriptores morfológicos, fisiológicos y del metabolismo de la colección de aislados siguiendo los procedimientos descritos en el Manual Bergey de Sistemática Bacteriana (Brenner et al. 2005). Los tipos principales de ensayos desarrollados fueron los siguientes: 1) respuesta a tinciones diferenciales, 2) forma bacteriana, 3) motilidad, 4) relación con el oxígeno, 5) actividad catalasa y oxidasa, 6) utilización de diferentes fuentes de carbono vía fermentativa, 7) utilización de urea como fuente de carbono, 8) fermentación ácido-mixta a partir de glucosa, 9) producción de 2,3-butanediol a partir de glucosa, 10) producción de indol a partir de triptófano, 11) hidrólisis enzimática de ADN, almidón y gelatina, 12) reducción de sulfatos a sulfuro de hidrógeno, 13) tolerancia a sales biliares, 14) prueba de la β -galactosidasa (ONPG), y 15) crecimiento a diferentes temperaturas (50 y 60°C). Los procedimientos experimentales correspondientes para cada ensayo son descritos en el manual de procedimientos del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología, UIS.

2.7 Análisis de grupos metabólicos de la colección de aislados

La información generada mediante los ensayos descritos en el acápite anterior, fue usada para desarrollar un análisis fenético con el fin de conocer los principales grupos metabólicos de la colección de aislados. Se incluyeron en el análisis 20 estirpes bacterianas de referencia (cepas ATCC) como controles. Se generó una matriz de datos binarios considerando los resultados positivos como uno (1) y los resultados negativos como cero (0). Las variables informativas, fueron usadas para calcular distancias fenotípicas (Euclidiana) entre aislados como medida de su proximidad metabólica. A partir de la matriz de distancia se construyó un dendrograma mediante el método de la media aritmética no ponderada (UPGMA). Los análisis computacionales fueron realizados en el programa STATISTICA (Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA).

2.8 Ensayos para la producción y determinación de gas metano

Los mantos de carbón identificados como productores de gases (según procedimiento descrito en el acápite 2.4.2), fueron seleccionados para desarrollar bioensayos que permitieran conocer la composición de la mezcla de gases producidos. Para ello, muestras de carbón de mantos promisorios fueron inoculadas en biorreactores diseñados a tales fines, los cuales contenían 15 mL de medio RCM carbonatado. Los mencionados biorreactores consistieron de tubos Pirex con aditamento lateral, el cual permitía la descarga del gas producido en un tubo BD Vacutainer al vacío con capacidad de 5 cm³. Cada ensayo incluyó un control positivo y negativo para la producción de gas. El control positivo consistió de un tubo Pirex sin el aditamento lateral conteniendo el mismo volumen del medio RCM y un tubo Durham invertido para capturar el gas. Por su parte el control negativo fue similar al control positivo solo que contenía agua en lugar del medio RCM (Figura 5). Los biorreactores fueron incubados durante 30 días y replicados a dos temperaturas (37° y 60°C).

Figura 5. Esquema de biorreactores usados para producción de gas a partir de muestras de carbón.



La composición del gas producido en tales ensayos se determinó mediante cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID), en el Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS) de la UIS. Para el análisis de la muestra gaseosa, se empleó un cromatógrafo de gases de la serie HP7890A (Agilent Technologies Inc., USA) equipado con un inyector de muestra del tipo HP7694E, un detector de ionización de llama (FID) y un sistema de análisis de datos ChemStation Rev. B.04.02. Se usaron columnas capilares tipo Carbón-PLOT (30m X 0.53 mm X 3 μ m) y de tamiz molecular (30m X 0.53mm X 50 μ m) de la misma casa comercial. Las temperaturas de la línea de transferencia y del detector permanecieron a 150 y 280°C, respectivamente. La programación de la temperatura del horno fue de la siguiente manera: 40°C (5 min), incrementos de 10°C/min (6 min) hasta 100°C, incrementos de 10°C/min (18 min) hasta 250°C. Como gas de arrastre se utilizó argón (99.995 %, Linde Colombia S.A, Bogotá, Colombia) a un flujo volumétrico de 12 mL/min.

2.9 Confirmación de la presencia de arqueobacterias metanogénicas en los biorreactores mediante la reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos

Como una vía de confirmación de la presencia metanógenos en los biorreactores descritos en el acápite anterior, se desarrolló una reacción de PCR usando oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen rRNA 16S de arqueobacterias metanogénicas. Para ello, se obtuvo ADN total (metagenoma) de los biorreactores del Manto 11 incubados a dos temperaturas (37 y 60°C), siguiendo el método de extracción con fenol/cloroformo (Maniatis et al. 1989) con las modificaciones propuestas por Liu (2009). La concentración del ADN se determinó por el método espectrofotométrico. Para la amplificación del gen rRNA 16S de arqueobacterias metanogénicas se usaron los oligonucleótidos descritos por Marchesi et al. (2001). Como control, se amplificó además el gen rRNA 16S de bacterias usando los cebadores universales descritos por Wani et al. (2006). La amplificación de la secuencia del mencionado gen se desarrolló usando la enzima de alta fidelidad DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas, USA) y un Termociclador MasterCycler® Pro-Realplex4 (Eppendorf, Alemania). Los amplicones fueron visualizados en electroforesis de agarosa y documentados usando un Sistema para Análisis de Geles (SYNGENE, USA). Detalles sobre soluciones y forma de desarrollo de los ensayos pueden encontrarse en el manual de procedimientos del Laboratorio Microbiología y Mutagénesis Ambiental, Escuela de Biología, UIS.

3. RESULTADOS

3.1 Desarrollo de la colección de aislados microbianos

En el presente estudio se desarrolló una colección de 47 aislados microbianos a partir de las muestras de carbón provenientes de los mantos carboníferos del flanco occidental del Sinclinal Checua-Lenguazaque, municipio de Cucunubá, Cundinamarca, Colombia. En el sinclinal, el número de aislados microbianos disminuyó de los segmentos superiores a los inferiores así: mantos superiores (26) > mantos medios (20) > mantos inferiores (1); siendo los mantos 11, 18 y 19 los que mostraron mayor carga microbiana (Tabla 6).

El diseño experimental establecido para el aislamiento de microorganismos que habitan mantos de carbón (en término de medios de cultivo y tipo de muestras), permitió aislar microorganismos con diferentes formas celulares y respuestas tintúrales así: bacilos Gram positivos (35), bacilos Gram negativos (6) y filamentos Gram positivos (6) (Anexo 1).

La gran mayoría de estos aislados (34) son microorganismos heterótrofos que pueden utilizar el acetato o la glucosa como fuente de carbono. Unos pocos aislados crecieron adecuadamente en medio mínimo de sales conteniendo como fuentes de carbono etanol (2), extracto de levadura (5) o glicerol (6). Las muestras de agua permitieron aislar el mayor número de microorganismos (34), mientras que a partir de muestras de carbón se obtuvieron solo 13 aislados microbianos. Los microorganismos aislados mostraron metabolismo aerobio estricto (11), anaerobio estricto (9) o facultativo (27), independientemente del tipo y el origen de las muestras ensayadas. El metabolismo aerobio estricto estuvo asociado al

medio mínimo de sales y el anaerobio estricto se asoció con el medio RCM. Sin embargo, los microorganismos con metabolismo facultativo se aislaron de ambos medios.

Tabla 6. Número de aislados microbianos obtenidos a partir de muestras de agua y carbón de los biorreactores correspondientes a cada manto de carbón y medio de cultivo ensayados.

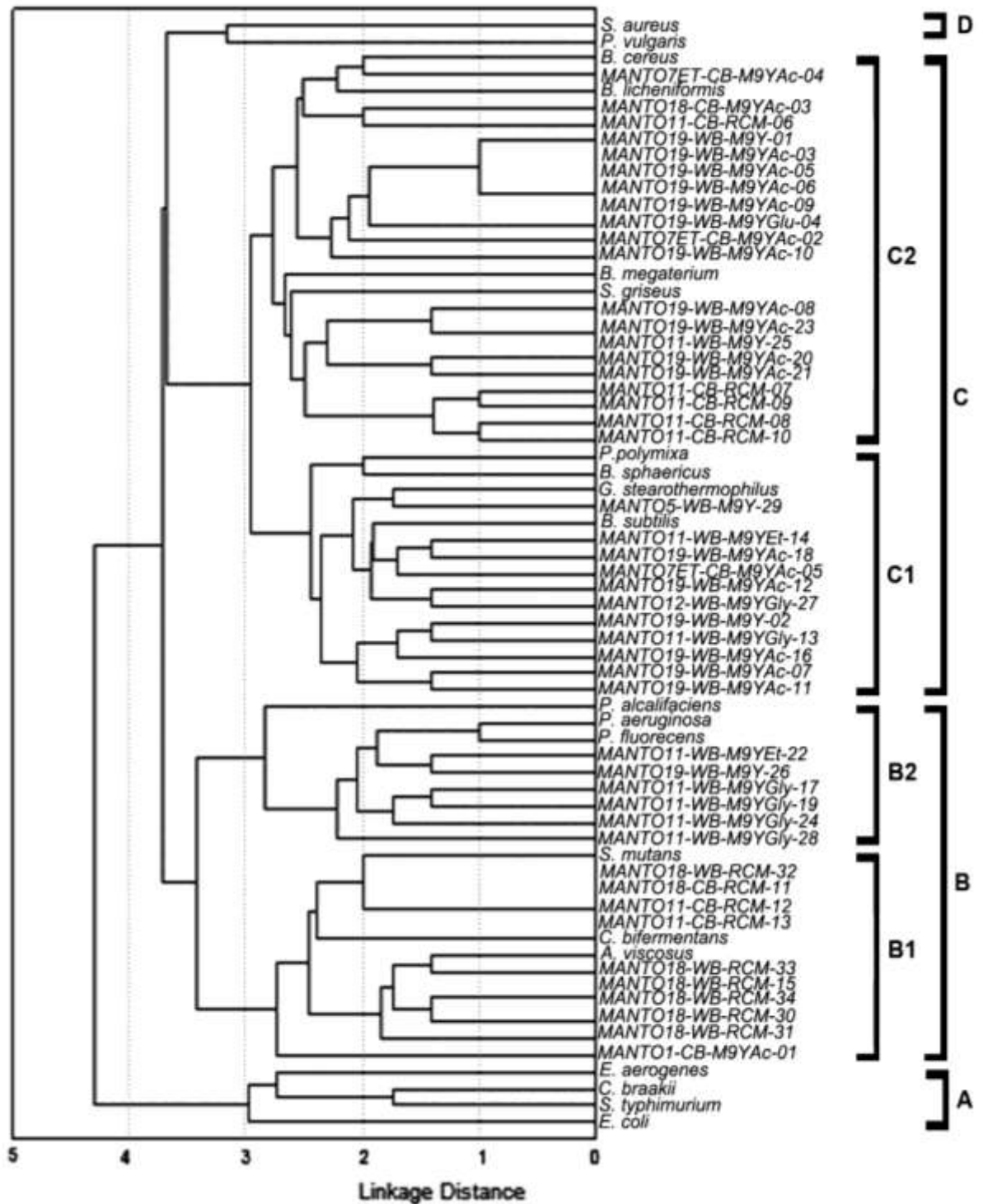
MEDIO DE CULTIVO †	MANTOS SUPERIORES			MANTOS MEDIOS					MANTOS INFERIORES		TOTALES
	Manto 19	Manto 18	Manto 17	Manto 12	Manto 11	Manto 7-LE	Manto 7-ET	Manto 5	Manto 3	Manto 1	
Muestras de agua											
M9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9Y	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	5
M9YGlu	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M9YAc	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
M9YGly	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	6
M9YEt	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
M9YMet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M9YPro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RCM	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6
SUBTOTALES	18	6	0	1	8	0	0	1	0	0	34
Muestras de carbón											
M9YAc	0	1	0	0	0	0	3	0	0	1	5
RCM	0	1	0	0	7	0	0	0	0	0	8
SUBTOTALES	0	2	0	0	7	0	3	0	0	1	13
TOTALES	26 aislados			20 aislados					1 aislados		47

(†) La composición de los medios de cultivos fue indicada en la Tabla 4.

3.2 Grupos metabólicos de la colección de aislados

Con el fin de conocer el perfil metabólico de la colección de aislados microbianos, se desarrolló un grupo de pruebas morfológicas, fisiológicas y del metabolismo de cada aislado (Anexo 3). Los 37 caracteres que resultaron informativos, fueron usados para calcular distancias fenotípicas (Euclidiana) entre cada par de aislados.

Figura 6. Grupos metabólicos de la colección de aislados basados en distancias fenotípicas.



En la Figura 6, se muestra un análisis de conglomerados basado en las distancias fenotípicas entre aislados. Los aislados se agruparon según su proximidad metabólica, formando cuatro grupos metabólicos principales (A-D), algunos de ellos con subgrupos. Cepas bacterianas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), fueron incluidas en el análisis de conglomerados con el fin de conocer la proximidad metabólica de los aislados a ciertos géneros bacterianos previamente identificados en los mantos de carbón.

Los grupos A y D resultaron ser los grupos metabólicamente más distantes. Ambos grupos estuvieron conformados únicamente por cepas de referencias y no incluyeron aislados de la colección. El Grupo A, estuvo constituido por cepas de referencia pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (*Escherichia coli* JM101 ATCC®33876™, *Salmonella typhimurium* ATCC®13311™, *Citrobacter braakii* ATCC®43162™, *Enterobacter aerogenes* ATCC®35029™); mientras que el Grupo D lo conformaron las cepas de referencia *Proteus vulgaris* ATCC®33420™ y *Staphylococcus aureus* ATCC®33592™. Así, todos los aislados de la colección se distribuyeron en los grupos B y C.

El Grupo B estuvo conformado por 16 aislados de la colección y 6 cepas de referencia que tienen en común una limitada capacidad fermentativa, medida como la producción de ácido y gas a partir de diferentes fuentes de carbono (Anexo 3). En dicho grupo, se puede distinguir dos subgrupos principales: B1 y B2.

El subgrupo B1, incluyó 10 aislados que usan el acetato y/o glucosa como fuente de carbono y cuyas características comunes fueron: su respuesta positiva a la tinción de Gram, su metabolismo anaerobio estricto y su crecimiento a altas temperaturas (50 y 60°C). Los aislados de este subgrupo con forma bacilar (MANTO18-CB-RCM-11, MANTO11-CB-RCM-12, MANTO11-CB-RCM-13 y MANTO18-WB-RCM-32), mostraron perfiles metabólicos similares a la cepa de referencia *Clostridium bifermentans* ATCC®10137™; mientras que aquellos

aislados con forma filamentosa (MANTO18-WB-RCM-31, MANTO18-WB-RCM-30, MANTO18-WB-RCM-34, MANTO18-WB-RCM-15 y MANTO18-WB-RCM-33) fueron metabólicamente próximos a la cepa de referencia *Actinomyces viscosus* ATCC®15987™. El aislado MANTO1-CB-M9YAc-01 y la cepa de referencia *Streptococcus mutans* ATCC®25175™, mostraron un perfil metabólico distinto a los restantes integrantes del subgrupo B1.

El subgrupo B2, incluyó 6 aislados que crecieron en diferentes fuentes de carbono (glicerol, extracto de levadura y etanol) y cuyas características comunes fueron: bacilos motiles con respuesta negativa a la tinción de Gram, con metabolismo aerobio estricto o facultativo, que crecen en Agar MacConkey y son positivos para la prueba de oxidasa. Los aislados de este subgrupo (MANTO11-WB-M9YGly-28, MANTO11-WB-M9YGly-24, MANTO11-WB-M9YGly-19, MANTO11-WB-M9YGly-17, MANTO19-WB-M9Y-26 y MANTO11-WB-M9YEt-22) mostraron perfiles metabólicos similares a la cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®10145™ y *Pseudomonas fluorescens* ATCC®13525™. Dentro del grupo B, la cepa de referencia *Providencia alcalifaciens* ATCC®51902™ se ubicó independiente de los subgrupos B1 y B2.

Por su parte, el Grupo C resultó ser el más complejo y metabólicamente diverso. Este grupo, estuvo representado por 31 aislados de la colección, 7 cepas de referencia del genero *Bacillus* y una del género *Streptomyces*. Los aislados contenidos en este grupo se caracterizaron en su mayoría, por ser bacilos motiles Gram positivos que producen endosporas, con metabolismo aerobio estricto o facultativo, positivos para las pruebas de catalasa y Voges-Proskauer y, por su capacidad fermentativa con producción de ácidos. En dicho grupo, se pueden distinguir dos subgrupos principales: C1 y C2.

El subgrupo C1, incluyó 11 aislados de la colección que crecieron en diferentes fuentes de carbono (acetato, glicerol, extracto de levadura y etanol) y cuyas

características comunes fueron: producción de 2,3-butanediol a partir de glucosa, fermentación ácido mixta mayormente a partir de manitol y el crecimiento a temperatura de 50°C. Los aislados de este subgrupo (MANTO19-WB-M9YAc-11, MANTO19-WB-M9YAc-07, MANTO19-WB-M9YAc-16, MANTO11-WB-M9YGly-13, MANTO19-WB-M9Y-02, MANTO12-WB-M9YGly-27, MANTO19-WB-M9YAc-12, MANTO7ET-CB-M9YAc-05, MANTO19-WB-M9YAc-18, MANTO11-WB-M9YEt-14 y MANTO5-WB-M9Y-29) mostraron perfiles metabólicos similares a la cepas de referencia *Bacillus subtilis* ATCC®6633™, *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* ATCC®10149™, *Paenibacillus* (*Bacillus*) *polymyxa* ATCC®43865™ y *Bacillus sphaericus* ATCC®4525™.

El subgrupo C2, incluyó 20 aislados de la colección que crecieron en diferentes fuentes de carbono (acetato y/o glucosa, y extracto de levadura) y cuyas características comunes fueron: producción de 2,3-butanediol a partir de glucosa, fermentación ácido mixta a partir glicerol, glucosa maltosa, manitol y sacarosa y crecimiento a temperatura de 50°C. Los aislados de este subgrupo (MANTO11-CB-RCM-10, MANTO11-CB-RCM-08, MANTO11-CB-RCM-09, MANTO11-CB-RCM-07, MANTO19-WB-M9YAc-21, MANTO19-WB-M9YAc-20, MANTO11-WB-M9Y-25, MANTO19-WB-M9YAc-23, MANTO19-WB-M9YAc-08, MANTO19-WB-M9YAc-10, MANTO7ET-CB-M9YAc-02, MANTO19-WB-M9YGlu-04, MANTO19-WB-M9YAc-09, MANTO19-WB-M9YAc-06, MANTO19-WB-M9YAc-05, MANTO19-WB-M9YAc-03, MANTO19-WB-M9Y-01, MANTO11-CB-RCM-06, MANTO18-CB-M9YAc-03 y MANTO7ET-CB-M9YAc-04) mostraron perfiles metabólicos similares a la cepas de referencia *Bacillus cereus* ATCC®10876™, *Bacillus licheniformis* ATCC®12759™, *Bacillus megaterium* ATCC®9885™, y *Streptomyces griseus* (*subsp. griseus*) ATCC®10137™.

Con base en los resultados arrojados por el análisis de conglomerados se puede plantear, que de todos los mantos de carbón evaluados de la formación Guaduas (Cundinamarca, Colombia) el Manto 11 presentó la comunidad microbiana

cultivable metabólicamente más diversa, la cual estuvo representada por todos los subgrupos metabólicos identificados en el sinclinal (Tabla 7). El orden de diversidad metabólica de las comunidades microbianas en los mantos sería de la siguiente manera: Manto 11 (B1, B2, C1 y C2) > Manto 19 (B2, C1 y C2) > Manto 18 (B1 y C2) > Manto 7ET (C1 y C2) > Manto 1 (B1) = Manto 5 (C1) = Manto 12 (C1).

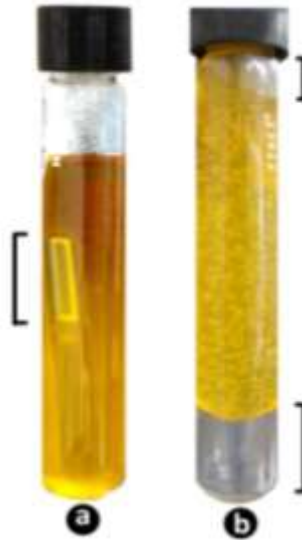
Tabla 7. Sub-grupos metabólicos por mantos de carbón.

Mantos de carbón	Sub-grupos metabólicos
Manto 1	B1
Manto 5	C1
Manto 7 ET	C1, C2
Manto 11	B1, B2, C1, C2
Manto 12	C1
Manto 18	B1, C2
Manto 19	B2, C1, C2

3.3 Mantos de carbón productores de gas biogénicos

Durante el desarrollo de la colección de aislados se constató la capacidad de algunas estirpes microbianas para la producción de gases. En medio líquido, esto se evidenció mediante la formación de burbujas en el tubo Durham; mientras que en medio semisólido, se constató el desplazamiento o rompimiento del medio de cultivo (Figura 7).

Figura 7. Producción de gases en medios líquidos (a) y semisólidos (b).



Considerando que los medios M9YAc y RCM que contienen acetato como fuente de carbono fueron los más efectivos para el aislamiento de microorganismos de los mantos de carbón (Tabla 6), se replicaron ensayos para identificar aquellos mantos productores de gas biogénico. Para ello, se esterilizó cada muestra de carbón por inmersión en 70% de etanol, con el fin de garantizar solo el crecimiento de microorganismos contenidos en el interior del carbón. Así, un triturado de cada muestra estéril se usó como inóculo en cada ensayo.

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en los mencionados ensayos. Ninguno de los biorreactores en medio M9YAc, mostró producción de gas (Figura 8). Por el contrario, los biorreactores en medio RCM para los Mantos 11 y 18, mostraron respuestas positivas (Figura 9).

Tabla 8. Producción de gas biogénico a partir de muestras de diferentes mantos de carbón en los medios M9YAc y RCM. Los biorreactores se incubaron por un máximo de 4 semanas a 37°C.

MUESTRA	RCM			M9YAc		
	1 réplica	2 réplica	3 réplica	1 réplica	2 réplica	3 réplica
Manto 5	-	-	-	-	-	-
Manto 1	-	-	-	-	-	-
Manto 18	+	+	+	-	-	-
Manto 7-ET	-	-	-	-	-	-
Manto 19	-	-	-	-	-	-
Manto 11	+	+	+	-	-	-
Manto 3	-	-	-	-	-	-
Manto 7-LE	-	-	-	-	-	-
Manto 12	-	-	-	-	-	-
Manto 17	-	-	-	-	-	-

RCM: Reinforced Clostridial medium; M9YAc: medio mínimo de sales M9 + extracto de levadura + acetato de sodio

Figura 8. Biorreactores en medio M9YAc. A: Manto 18, B: Manto 7- ET, C: Manto 17, D: Manto 12, E: Manto 7- LE, F: Manto 3, G: Manto 11, H: Manto 19, I: Manto 1, J: Manto 5.



Figura 9. Biorreactores en medio RCM. A: Manto 5, B: Manto 1, C: Manto 18, D: Manto 7- ET, E: Manto 19, F: Manto 11, G: Manto 3, H: Manto 7- LE, I: Manto 12, J: Manto 17.



El aislamiento y purificación de los microorganismos que conforman consorcios productores de gas biogénico, requirió la combinación de diferentes criterios (método del número más probable, uso de indicadores de pH, combinación de medio líquido y semisólido, incubación a diferentes temperaturas, etc.) en una única metodología de purificación (Figura 4). Dicha metodología permitió la purificación de la totalidad de los aislados anaerobios estrictos y productores de gases biogénicos provenientes de los Mantos 11 y 18.

Los aislados que conformaron los consorcios productores de gas biogénico mostraron características culturales bien diferenciadas tanto en medio líquido (Figura 10) como en semisólido (Figura 11). En medio líquido, el modo de crecimiento estuvo determinado por el tipo de metabolismo microbiano en relación al oxígeno; mientras que en medio semisólido se presentaron diferentes tipos de colonias.

Figura 10. Crecimiento diferenciado en medio líquido para los aislados del consorcio productor de gases. (1) Metabolismo facultativo. (2 y 4) Metabolismo anaerobio. (3) Metabolismo microaerófilo.

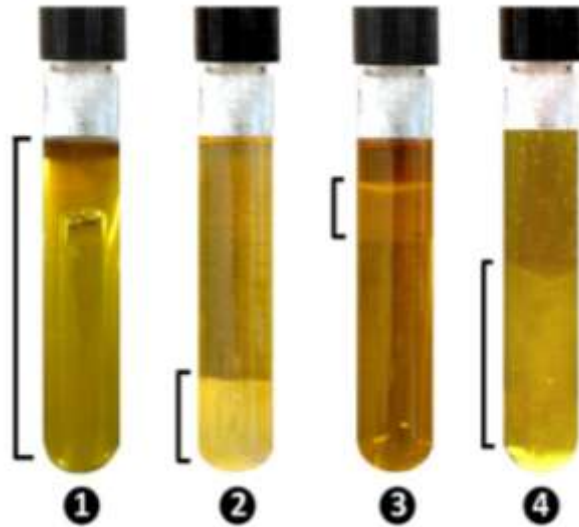
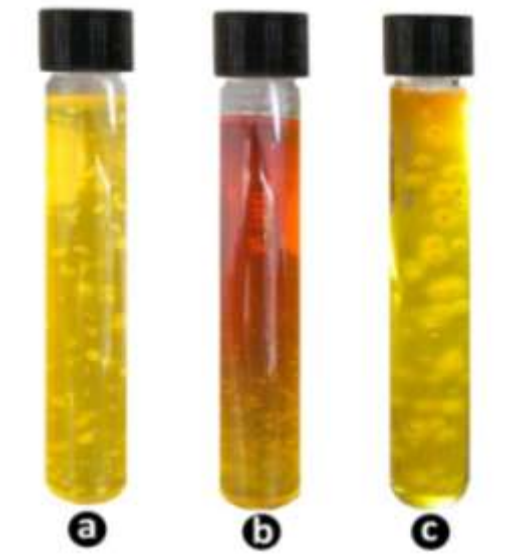
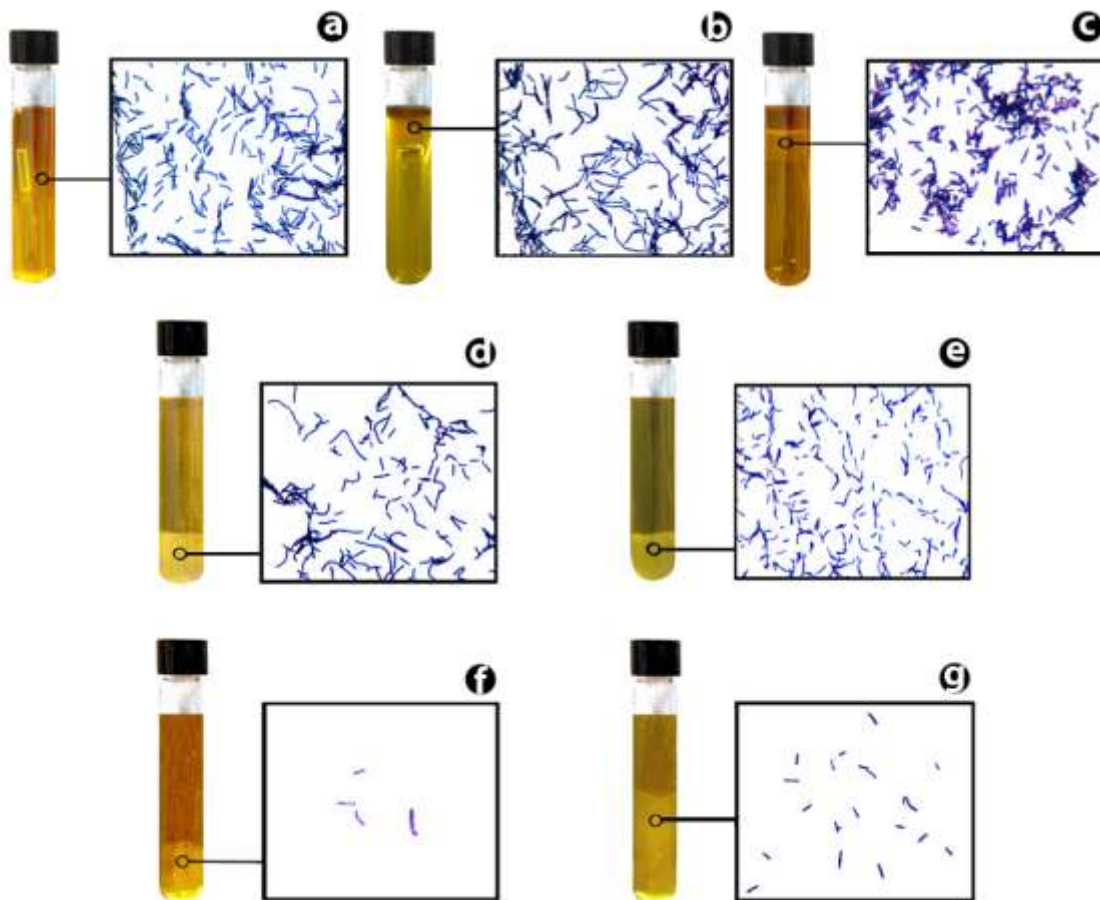


Figura 11. Tipo de colonias producidas en medio semisólido por los aislados del consorcio productor de gases. (a) Forma de discos. (b) Forma de puntos. (c) Forma de motas filamentosas.



Con base en la caracterización microscópica de los aislados que conformaron los consorcios productores de gas biogénico, al menos 7 estirpes microbianas diferentes conforman el mencionado consorcio (Figura 12). Todas las estirpes microbianas resultaron positivas para la tinción de Gram, pero difirieron en el tipo de metabolismo microbiano con relación al oxígeno (Anexo 3).

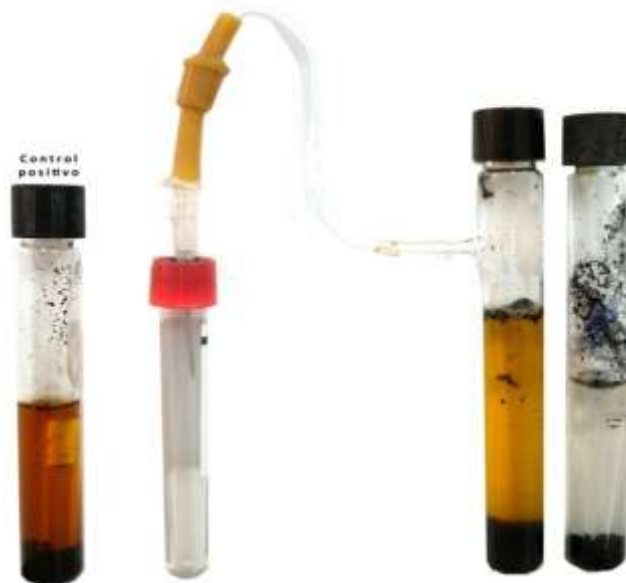
Figura 12. Tipos celulares que componen el consorcio productor de gas biogénico del Manto 11. (a) MANTO11-CB-RCM-06, (b) MANTO11-CB-RCM-07, (c) MANTO11-CB-RCM-08, (d) MANTO11-CB-RCM-09, (e) MANTO11-CB-RCM-10, (f) MANTO11-CB-RCM-12 y (g) MANTO11-CB-RCM-13.



3.4 Análisis de la composición de los gases biogénicos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama

Con el fin de conocer la composición de la mezcla de gases biogénicos producidos en el manto que mostró la mayor diversidad de morfotipos (Manto 11, Figura 12), se diseñó un biorreactor que consistió en un tubo Pirex con aditamento lateral que descarga el gas producido en un tubo BD Vacutainer al vacío de capacidad de 5 cm³ (Figura 13).

Figura 13. Biorreactores para la detección de gas en muestras de carbón.



Los biorreactores fueron replicados e incubados durante 30 días a dos temperaturas diferentes (37°C y 60°C). Todos los bioensayos replicados, produjeron gas a partir de las 48 horas de incubación tanto a 37°C como a 60°C.

El análisis mediante cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID) de la mezcla de gases producida por los consorcios microbianos en los biorreactores (contenida en los tubo BD Vacutainer), permitió conocer la composición de la misma. Para ello se utilizó un patrón de gases cuyos tiempos de retención en minutos se presentan en la Tabla 9.

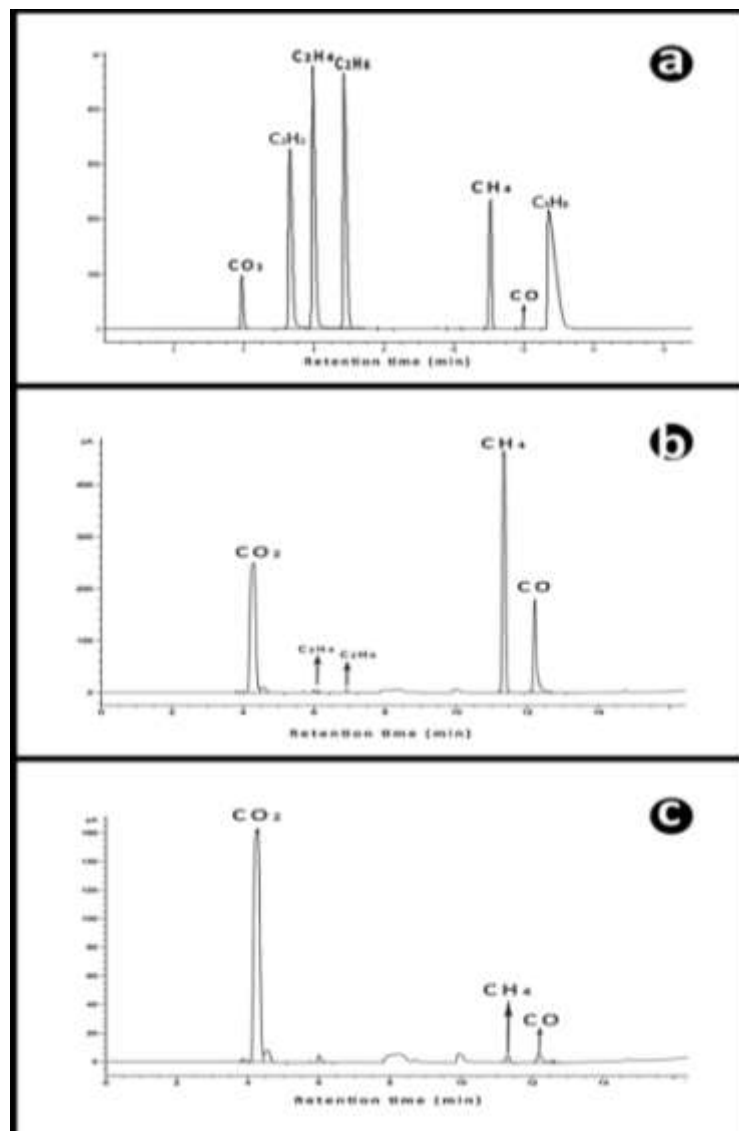
Tabla 9. Tiempos de retención de la mezcla de gases patrón usada en el análisis cromatográfico (GC-FID).

Compuesto	Tiempo de retención
Dióxido de carbono	3.872
Acetileno	5.306
Etileno	5.997
Etano	7.023
Hidrógeno	9.241
Oxígeno	9.892
Nitrógeno	10.332
Metano	11.038
Monóxido de carbono	11.955
Propano	12.709

En la Figura 14, se muestran los perfiles cromatográficos de las muestras. Comparando con los tiempos de retención del patrón de gases (Figura 14a), todos los biorreactores (ensayos replicados) del Manto 11 a 37°C (Figura 14b) mostraron una mezcla de gases compuesta mayoritariamente por dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y monóxido de carbono (CO). El perfil cromatográfico de los biorreactores del Manto 11 a 60°C (Figura 14c) mostró una significativa reducción de los picos correspondientes para el metano (CH₄) y monóxido de carbono (CO), indicando que estos gases biogénicos no son producidos a dicha temperatura. Los resultados obtenidos sugieren la co-existencia de arqueobacterias metanogénicas

mesófilas y bacterias fermentativas mesófilas y termófilas en el consorcio microbiano del Manto 11.

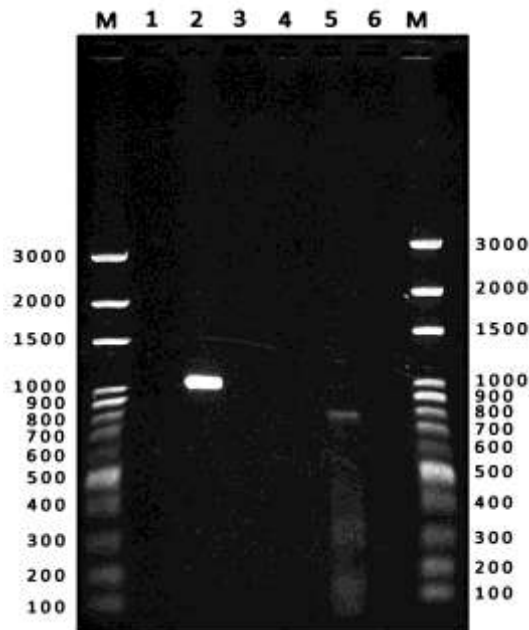
Figura 14. Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID). (a) Patrón de gases. (b) Mezcla de gases del biorreactor del Manto 11 a 37°C (c) Mezcla de gases del biorreactor del Manto 11 a 60°C.



3.5 Confirmación de la presencia de arqueobacterias metanogénicas en los biorreactores de Manto 11.

En el acápite anterior se pudo demostrar indirectamente la presencia de metanógenos en los biorreactores de Manto 11 usando cromatografía de gases (GC-FID) para la detección de metano. En la Figura 15, se muestran los resultados obtenidos en la reacción de PCR usando cebadores específicos para arqueobacterias metanogénicas y cebadores universales para bacterias.

Figura 15. Electroforesis correspondiente a las amplificaciones del metagenoma del Manto 11 usando cebadores específicos de arqueobacterias metanogénicas y cebadores universales de bacterias. De izquierda a derecha, el orden es el siguiente: M: marcador; 1: Control negativo; 2: Manto 11 a 37°C con cebadores universales de bacterias; 3: Manto 11 a 60°C con cebadores universales de bacterias; 4: Control negativo; 5: Manto 11 a 37°C con cebadores específicos de metanógenos; 6: Manto 11 a 60°C con cebadores específicos de metanógenos.



Como se puede observar, una banda de alrededor de 800 pb fue obtenida de la amplificación del metagenoma del biorreactor del Manto 11 incubado a 37°C, pero no a 60°C; en correspondencia con los resultados mostrados en la Figura 14. La Figura 15 muestra además, una banda de aproximadamente 1000 pb cuando se utilizan los cebadores universales de bacterias para amplificar el metagenoma del Manto 11 a 37°C, confirmando la existencia de un consorcio bacteria/arqueobacterias metanogénicas en el Manto 11.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se caracterizaron grupos metabólicos cultivables que conforman los consorcios microbianos que habitan mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia); e igualmente, se demostró su relación con la producción de gas biogénico en dichos mantos.

Como se esperaba, la abundancia microbiana en los mantos de carbón (en términos del número de aislados recuperados) disminuyó de los segmentos superiores a los inferiores del sinclinal. Así, la diversidad metabólica de las comunidades microbianas, medidas como el número de grupos metabólicos diferentes presentes en los mantos, fue mayor para mantos superiores y medios (4 grupos) respecto a los inferiores (solo un 1 grupo) en correspondencia con lo observado en otras formaciones geológicas (Parkes et al. 2000; D'Hondt et al. 2004; Fry et al. 2009); donde factores como la carencia de fuentes de energía, oxígeno y nutrientes adecuados son determinantes en dicho patrón. Estos resultados, unidos al hallazgo de la naturaleza meteórica de las aguas de todos los mantos del mencionado sinclinal (Araque-Nuñez y García-González, 2011), soportan la hipótesis que plantea que las poblaciones microbianas que habitan mantos de carbón podrían estar fuertemente influenciadas por infiltraciones de aguas meteóricas que arrastran microorganismos desde la superficie hacia el subsuelo profundo (Scott et al. 1994).

En correspondencia con un estudio previo (Shimizu et al. 2007), los resultados mostraron poca coincidencia entre el método de enriquecimiento microbiológico aquí usado y el método de composición isotópica (Rice, 1993) que determina la naturaleza biogénica del gas producido en el manto de carbón mediante la medición de la composición y proporción de isótopos estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^1\text{D}$ de metano. Araque-Nuñez y García-González (2011), estudiaron el mencionado

sinclinal usando el método de composición isotópica ($\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^{13}\text{C}$) del metano, encontrando presencia de gas biogénico en los Mantos 1, 7ET y 18, de gas termogénico en los Mantos 5, 7LE, 11 y 17; mientras que los mantos restantes resultaron con mezcla de ambos tipos de gases (Anexo 4). En el presente estudio, usando el método de enriquecimiento microbiológico acoplado a cromatografía de gases, se evidenció producción de gas sólo a partir de carbón de los Mantos 11 y 18; sugiriendo la conveniencia del uso complementario de ambos métodos para obtener resultados más precisos. Con base en los resultados obtenidos en ambos estudios se podría plantear que los mantos superiores y medios del sinclinal están compuestos por una mezcla de gases biogénico y termogénico.

Este estudio constituye un primer intento por conocer la composición de los consorcios microbianos que habitan los mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia). El uso de diferentes cepas de referencia permitió conocer la proximidad metabólica de la colección de aislados a grupos metabólicos tipo, varios de ellos identificados previamente en mantos de carbón. Tal es el caso, de los miembros de las familias Actinomycetaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Pseudomonadaceae y Streptomycetaceae (Shimizu et al. 2007; Strąpoć et al. 2007; Green et al. 2008; Klein et al. 2008; Li et al. 2008; Fry et al. 2009; Jones et al. 2010; Midgley et al. 2010; Penner et al. 2010; Guo et al. 2012; Tang et al. 2012). Por otra parte, miembros de la familia Enterobacteriaceae generalmente presente en estos ambientes, y que son relativamente fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio, no fueron aislados a partir de las muestras estudiadas; posiblemente debido a la naturaleza salobre y sódica de las aguas de los mantos del sinclinal (Anexo 5), la cual podría limitar el crecimiento de miembros de esta familia en las zonas de estudio. Adicionalmente, el alto contenido de iones sulfatos en los mantos de los segmentos superiores y medios, así como la ausencia de bacterias sulfatoreductoras en la colección de aislados; sugiere que este último grupo de

microorganismos no es frecuente en dichos mantos y por tanto que existe un ambiente adecuado para la producción de gas biogénico.

A pesar de las mencionadas limitaciones de los métodos de enriquecimiento microbianos para el estudio de metanógenos (Garcia et al. 2000), aquí se pudo cultivar exitosamente y evidenciar la complejidad de los consorcios involucrados en la producción de gas biogénico en mantos de carbón del sinclinal (Mantos 11 y 18). El Manto 11 resultó metabólicamente más diverso y este se caracterizó por la presencia de los cuatro grupos metabólicos. A tales fines, resultó esencial el uso del medio de cultivo RCM.

El medio RCM es ampliamente usado para el recuento de microorganismos anaerobios estrictos esporulados, especialmente de *Clostridium sp.* (Hirsch y Grinstead, 1954). Este medio contiene diferentes fuentes de carbono (glucosa, acetato, almidón soluble), nitrógeno, vitaminas y aminoácidos (extractos de carne y de levaduras y peptonas), un compuesto que mantiene el equilibrio osmótico (cloruro de sodio), un agente reductor (clorhidrato de cisteína), un amortiguador de pH (acetato de sodio) y pequeñas cantidades de Agar que retardan la difusión de gases y sustancias reducidas (Acumedia, 2010). En este caso, posiblemente la naturaleza enriquecida y reductora del medio RCM, así como las condiciones de cultivos aplicadas en los ensayos (condiciones de anaerobiosis, temperatura, pH, etc.), permitieron el co-cultivo de especies microbianas esenciales del consorcio y finalmente su aislamiento exitoso (Figura 12).

Adicionalmente, el medio RCM permitió la producción de gas metano por consorcios microbianos presentes en las muestras de carbón ensayadas. Para el Manto 11, la producción de metano fue evidenciada a una temperatura de 37°C, pero no a 60°C (Figura 14), indicando que la metanogénesis es inhibida a altas temperaturas a pesar de que varios miembros del consorcio son termófilos. Este hallazgo, coincide con lo observado por otros autores (Green et al. 2008; Midgley

et al. 2010; Penner et al. 2010; Beckmann et al. 2011), quienes mostraron una temperatura óptima entre 30 y 38°C para la producción de metano biogénico en cultivos de enriquecimiento a partir de muestras de carbón. Otros autores con estudios similares (Strapoć et al. 2007; Jones et al. 2010; Opara et al. 2012), han mostrado que la producción de metano a partir de muestras de carbón puede ocurrir a temperatura relativamente más bajas (entre 17 y 23°C).

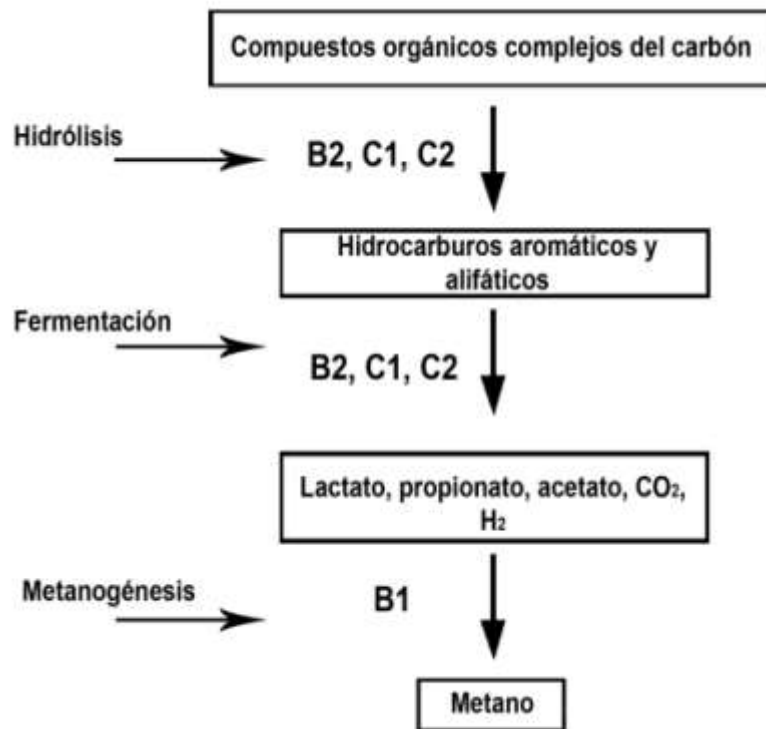
En general, se conoce muy poco sobre el metabolismo de los consorcios microbianos responsables de la producción de gas metano; lo cual ha hecho difícil el aislamiento y el estudio de los componentes de estos consorcios (Garcia et al. 2000). La mayoría de los estudios desarrollados en mantos de carbón, hacen inferencias de los grupos metabólicos con base en el análisis de secuencias de la subunidad 16S del gen ribosomal del metagenoma de muestras de carbón o de agua de las minas (Shimizu et al. 2007; Klein et al. 2008; Li et al. 2008; Fry et al. 2009; Guo et al. 2012; Tang et al. 2012) o de cultivos enriquecidos (Green et al. 2008; Kruger et al. 2008; Midgley et al. 2010; Penner et al. 2010). Sin embargo, solo unos pocos estudios han logrado identificar y/o cultivar componentes del consorcio microbiano directamente involucrado en la producción del gas biogénico (Strapoć et al. 2007; Jones et al. 2010; Beckmann et al. 2011; Opara et al. 2012).

Como se indicó previamente en el marco teórico, en general se acepta que existen dos procesos principales por los cuales los microorganismos producen metano en las formaciones de carbón. Estos son: 1) reducción del dióxido de carbono ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) y 2) fermentaciones dependientes de metilos ($\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$); siendo el primer mecanismo el más frecuente (Wang et al. 2010). Recientemente, se ha mostrado que la metanogénesis dependiente de H_2 ($\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_{2,\text{aq}} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$) también ocurre en algunas formaciones geológicas con mantos de carbón (Strapoć et al. 2007).

Como se mostró en la Figura 1, los sustratos orgánicos complejos presentes en el carbón son convertidos por bacterias fermentativas y/o acetogénicas en compuestos simples, que pueden ser usados por las arqueobacterias metanogénicas para producir metano. Basado en el conocimiento existente sobre biodegradación de carbón (Strandberg y Lewis, 1987; Quigley et al. 1989, Crawford y Gupta, 1991; Strapoć et al. 2007; Formolo et al. 2008; Warwick et al. 2008; McInerney et al. 2009; Orem et al. 2010; Wang et al. 2010), se cree que las bacterias fermentativas hidrolizan y fermentan los sustratos orgánicos presentes en el carbón, produciendo metabolitos primarios como: cadenas largas de ácidos grasos, n-alcanos, isoprenoides, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, acetato, CO_2 , H_2 , NH_4^+ y HS^- . Las bacterias acetogénicas pueden consumir H_2 y CO_2 , dimetoxilar material de bajo peso molecular, o hidrolizar compuestos aromáticos, para producir acetato. Otras bacterias acetogénicas productoras de H_2 , pueden convertir ácidos grasos, alcoholes y algunos compuestos aromáticos y aminoácidos, en H_2 , CO_2 y acetato. La actividad de los metanógenos (Arqueobacterias) constituye la última pero más importante etapa del proceso, donde H_2 , CO_2 , formato y acetato, son usados para producir metano (Strapoć et al. 2007; Formolo et al. 2008; Warwick et al. 2008; McInerney et al. 2009; Orem et al. 2010; Wang et al. 2010).

La existencia de 4 grupos metabólicamente diferentes en el Manto 11, es una clara evidencia de la complejidad metabólica de los consorcios que producen metano a partir de carbón bituminoso. Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de enriquecimiento microbiano acoplado a cromatografía de gases (GC-FID) y reacción de PCR con cebadores específicos metanógenos y universal de bacterias; aquí se propone un modelo de degradación del carbón bituminoso para la producción de gas biogénico en los mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Figura 16).

Figura 16. Modelo de degradación del carbón bituminoso para la producción de gas biogénico.



Análisis preliminares usando cromatografía de gases/espectrometría de masas, han demostrado la presencia de hexanos, iso-hexanos y metil-ciclopentanos en los biorreactores del Manto 11 (datos no publicados). Con base en esta información y en los datos presentados en este estudio, se podría plantear que las bacterias con alta capacidad de biodegradación en el Manto 11 (Anexo 3) deben hidrolizar las macromoléculas orgánicas del carbón a compuestos intermediarios primarios como los hidrocarburos aromáticos y alifáticos; y luego por vía fermentativa, convertir estos en metabolitos secundarios como: lactato, propionato, acetato H₂, y en especial CO₂. Como ya se indicó, algunos aislados de los sub-

grupos C1 y C2 están metabólicamente relacionados a cepas de referencia de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*; para los cuales ha sido previamente reportada actividad hidrolítica y de solubilización del carbón (Strandberg y Lewis, 1987; Quigley et al. 1989) y/o de hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Bodour et al. 2003; Arvanitis et al. 2008; Marcos et al. 2009).

Adicionalmente, miembros del sub-grupo B2 con metabolismo facultativo relacionado al género *Pseudomonas*, cuyas especies solubilizan y despolimerizan el carbón (Crawford y Gupta, 1991) y degradan hidrocarburos aromáticos (Mikesell et al. 1993; Gülensoy y Alvarez 1999), podrían además contribuir a la producción de metabolitos secundarios. Por último, algún miembro del sub-grupo B1 con metabolismo anaerobio estricto típico de metanógenos, debe utilizar alguno de los metabolitos secundarios, posiblemente CO₂ (Figura 14), para la producción del metano detectado en el biorreactor del Manto 11.

Llama la atención, que tanto la detección de metano mediante CG-FID, como la identificación de arqueobacterias metanógenas mediante PCR con cebadores específicos, solo es posible en biorreactores cultivados a 37°C; cuando una buena parte de los aislados con metabolismo anaerobio estricto crecen a 60°C. En tal sentido, los aislados de los grupos B2 y C1 que muestran metabolismo facultativo y que no crecen a 60°C pueden ser de particular importancia en los consorcios productores de gas biogénico. Se requerirá un análisis genético de todos los aislados del Manto 11 usando PCR con cebadores específicos, para determinar los miembros particulares de los consorcios productores de gas biogénico del Manto 11.

5. CONCLUSIONES

Los componentes bacterianos de los consorcios microbianos presentes en los mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia), muestran proximidad metabólica a miembros de las familias Actinomycetaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Pseudomonadaceae y Streptomycetaceae.

El medio RCM y las condiciones de cultivo aplicadas en los ensayos microbiológicos, resultaron adecuados para el aislamiento de microorganismos de metabolismo anaerobio que conforman consorcios productores de gas biogénico. Adicionalmente, los métodos de enriquecimiento microbiano acoplado a cromatografía de gases y la PCR con cebadores específicos, permitieron inferir la presencia de arqueobacterias metanogénicas en los mantos de carbón, y por tanto su posterior aislamiento.

De los diez mantos de carbón estudiados solamente en los Mantos 11 y 18 se constató la producción de gas biogénico. El consorcio microbiano del Manto 11 resultó ser el metabólicamente más diverso, y los metanógenos mesófilos de este consorcio utilizaron principalmente el mecanismo de reducción del CO₂ para producir metano.

6. RECOMENDACIONES

Identificar las especies microbianas que componen la colección de aislados microbianos obtenidos en este estudio, mediante el análisis de secuencia del gen del RNA ribosomal 16S.

Realizar estudios con el metagenoma ambiental de los mantos de carbón del Sinclinal Checua-Lenguazaque (Cucunubá, Cundinamarca, Colombia) usando técnicas de ecología molecular, con el fin de inferir la diversidad microbiana (microorganismos cultivables y no cultivables) presentes en dichos mantos.

Ampliar los estudios del consorcio del Manto 18 con el fin de comprobar la presencia de metano en el gas biogénico aquí detectado.

Realizar estudios encaminados a la identificación de intermediarios metabólicos para precisar el mecanismo de generación de metano biogénico a partir de carbón bituminoso.

BIBLIOGRAFÍA

Acumedia. 2010. Reinforced clostridial medium (7714). Neogen Corporation, Rev 2.

Ahmed M, Smith JW. 2001. Biogenic methane generation in the degradation of eastern Australian Permian coals. *Organic Geochemistry* 32:809-816.

Araque-Nuñez YK, García-González M. 2011. Estudio de los procesos termogénicos y bacteriogénicos en la generación de gas asociado a mantos de carbón en la formación Guaduas. Tesis de grado. Escuela de Geología, Universidad Industrial de Santander (UIS).

Aravena R, Harrison SM, Barker JF, Abercrombie H, Rudolph D. 2003. Origin of methane in the Elk Valley coalfield, southeastern British Columbia, Canada. *Chemical Geology* 195:219-227.

Arvanitis N, Katsifas EA, Chalkou KI, Meintanis C, Karagouni AD. 2008. A refinery sludge deposition site: presence of nahH and alkJ genes and crude oil biodegradation ability of bacterial isolates. *Biotechnology Letters* 30:2105–2110.

Barker CE, Dallegge T. 2006. Secondary gas emissions during coal desorption, Marathon Grassim Oskolkoff-1 Well, Cook Inlet Basin, Alaska: implications for resource assessment. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology* 54:273-291.

Beaton A, Langenberg W, Pană C. 2006. Coalbed methane resources and reservoir characteristics from the Alberta Plains, Canada. *International Journal of Coal Geology* 65:93-113.

Beckmann S, Lueders T, Krüger M, von Netzer F, Engelen B, Cypionka H. 2011. acetogens and acetoclastic methanosarcinales govern methane formation in abandoned coal mines. *Applied and Environmental Microbiology* 77(11):3749–3756.

Bell JS. 2006. In-situ stress and coal bed methane potential in Western Canada. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology* 4:197-220.

Bodden WR III, Ehrlich R. 1998. Permeability of coals and characteristics of desorption tests: Implications for coalbed methane production. *International Journal of Coal Geology* 35:333-347.

Bodour AA, Wang JM, Brusseau ML, Maier RM. 2003. Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environmental Microbiology* 5:888–895.

Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity, G.M (Ed), 2nd edition, Volume 2. The Proteobacteria (Part A, B, C), Springer Edition, Michigan.

Butland CI, Moore TA. 2008. Secondary biogenic coal seam gas reservoirs in New Zealand: A preliminary assessment of gas contents. *International Journal of Coal Geology* 76:151-165.

Catcheside DEA, Ralph JP. 1999. Biological processing of coal. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:16-24.

Cheung K, Sanei H, Klassen P, Mayer B, Goodarzi F. 2009. Produced fluids and shallow groundwater in coalbed methane (CBM) producing regions of Alberta, Canada: Trace element and rare earth element geochemistry. *International Journal of Coal Geology* 77:338-349.

Cheung K, Klassen P, Mayer B, Goodarzi F, Aravena R. 2010. Major ion and isotope geochemistry of fluids and gases from coalbed methane and shallow groundwater wells in Alberta, Canada. *Applied Geochemistry* 25:1307-1329.

Crawford DL, Gupta RK. 1991. Characterization of extracellular bacterial enzymes which depolymerize a soluble lignite coal polymer. *Fuel* 70:577-580.

D'Hondt S, Jorgensen BB, Miller DJ, Batzke A, Blake R, Cragg BA, Cypionka H, Dickens GR, Ferdelman T, Hinrichs KU, Holm NG, Mitterer R, Spivack A, Wang G, Bekins B, Engelen B, Ford K, Gettemy G, Rutherford SD, Sass H, SkilbeckCG, Aiello IW, Guèrin G, House CH, Inagaki F, Meister P, Naehr T, Niitsuma S, Parkes RJ, Schippers A, Smith DC, Teske A, Juergen Wiegel, Naranjo-Padilla C, Solis-

Acosta JL. 2004. Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science* 306:2216–2221.

Elshahed MS. 2010. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. *Journal of Advanced Research* 1:103-111.

Faiz M, Hendry P. 2006. Significance of microbial activity in Australian coal bed methane reservoirs - A review. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology* 54:261-272.

Flores RM. 2008. Microbes, methanogenesis, and microbial gas in coal. *International Journal of Coal Geology* 76:1-2.

Flores RM, Rice CA, Stricker GD, Warden A, Ellis MS. 2008. Methanogenic pathways of coal-bed gas in the Powder River Basin, United States: the geologic factor. *International Journal of Coal Geology* 76:52-75.

Formolo M, Martini A, Petsch S. 2008. Biodegradation of sedimentary organic matter associated with coalbed methane in the Powder River and San Juan Basins, U.S.A. *International Journal of Coal Geology* 76:86-97.

Fry JC, Horsfield B, Sykes R, Cragg BA, Heywood C, Kim GT, Mangelsdorf K, Mildenhall DC, Rinna J, Vieth A, Zink KG, Sass H, Weightman AJ, Parkes RJ. 2009. Prokaryotic Populations and Activities in an Interbedded Coal Deposit,

Including a Previously Deeply Buried Section (1.6-2.3 km) Above ~ 150 Ma Basement Rock. *Geomicrobiology Journal* 26:163–178.

Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B. 2000. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* (2000) 6:205-226.

García-González M. 2010. Coalbed methane resources in Colombia. En: AAPG International Convention and Exhibition, *Frontiers of Unconventional Thinking*, Calgary, Alberta, Canada.

Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. 2008. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, U.S.A. *International Journal of Coal Geology* 76:34-45.

Guo H, Liu R, Yu Z, Zhang H, Yun J, Li Y, Liu X, Pan J. 2012. Pyrosequencing reveals the dominance of methylotrophic methanogenesis in a coal bed methane reservoir associated with Eastern Ordos Basin in China. *International Journal of Coal Geology* 93:56–61.

Guoyi H, Jin L, Xiuqin S, Zhongxi H. 2010. The origin of natural gas and the hydrocarbon charging history of the Yulin gas field in the Ordos Basin, China. *International Journal of Coal Geology* 81:381-391.

Gupta A, Birendra K. 2000. Biogasification of coal using different sources of microorganisms. *Fuel* 79:103-105.

Gülensoy N, Alvarez PJ. 1999. Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. *Biodegradation* 10:331–340.

Harris SH, Smith RL, Barker CE. 2008. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *International Journal of Coal Geology* 76:46-51.

Hirsch A, Grinstead E. 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *Journal of Dairy Research* 21:101-110.

Hofrichter M, Fakoussa R. 2001. Microbial degradation and modification of coal. In: Hofrichter, M., Steinbüchel, A. (eds) *Biopolymers. Lignin, Humic Substances and Coal*. Wiley-VCH, Weinheim 1:393-429.

Hoşgörmez H, Namik Yalcin M, Cramer B, Gerling P, Faber E, Schaefer RG, Mann U. 2002. Isotopic and molecular composition of coal-bed gas in the Amasra region (Zonguldak basin- Western Black Sea). *Organic Geochemistry* 33:1429-1439.

Johnson ER, Klasson KT, Basu R, Volkwein JC, Clausen EC, Gaddy JL. 1994. Microbial conversion of high-rank coals to methane. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45/46:329-338.

Johnson RC, Flores RM. 1998. Developmental geology of coalbed methane from shallow to deep in Rocky Mountains basin and in Cook Inlet-Matanuska basin Alaska, USA and Canada. *International Journal of Coal Geology* 35:241-282.

Jones EJP, Voytek MA, Corum MD, Orem WH. 2010. Stimulation of Methane Generation from Nonproductive Coal by Addition of Nutrients or a Microbial Consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 76(21):7013-7022.

Jones EJP, Voytek MA, Warwick PD, Corum MD, Cohn A, Bunnell JE, Clark AC, Orem WH. 2008. Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal Geology* 76:138-150.

Kinnon ECP, Golding SD, Boreham CJ, Baublys KA, Esterle JS. 2010. Stable isotope and water quality analysis of coal bed methane production waters and gases from the Bowen Basin, Australia. *International Journal of Coal Geology* 82:219-231.

Klein DA, Flores RM, Venot C, Gabbert K, Schmidt R, Stricker GD, Pruden A, Mandernack K. 2008. Molecular sequences derived from Paleocene Fort Union Formation coals vs. associated produced waters: Implications for CBM regeneration. *International Journal of Coal Geology* 76:3-13.

Kotarba MJ, Rice DD. 2001. Composition and origin of coalbed gases in the Lower Silesian basin, southwest Poland. *Applied Geochemistry* 16:895-910.

Kruger M, Beckmann S, Engelen B, Thielemann T, Cramer B, Schippers A, Cypionka H. 2008. Microbial methane formation from hard coal and timber in an abandoned coal mine. *Geomicrobiology Journal* 25:315–321.

Levine DG, Schlosberg RH, Silbernagel BG. 1982. Understanding the chemistry and physics of coal structure (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:3365–3370.

Li D, Hendry P, Faiz M. 2008. A survey of the microbial populations in some Australian coalbed methane reservoirs. *International Journal of Coal Geology* 76:14-24.

Liu D. 2009. Purification of Nucleic Acids from Bacteria. In: *Handbook of Nucleic Acid Purification*. Liu D. (Ed.), Taylor & Francis CRC Press, Cap. 5.

Longwell JP, Rubint ES, Wilson J. 1995. Coal: energy for the future. *Progress in Energy and Combustion Science* 21:269-360.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Marchesi JR, Weightman AJ, Cragg BA, Parker RJ, Fry JC. 2001. Methanogen and bacterial diversity and distribution of deep gas hydrate sediments from the Cascadian Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 34:221-228.

Marcos MS, Lozada M, Dionisi HM. 2009. Aromatic hydrocarbon degradation genes from chronically polluted Subantarctic marine sediments. *Letters in Applied Microbiology* 49:602–608.

Mares TE, Moore TA. 2008. The influence of macroscopic texture on biogenically-derived coalbed methane, Huntly coalfield, New Zealand. *International Journal of Coal Geology* 76:175-185.

Martínez YA. 2009. Determinación de la composición de los gases asociados a mantos de carbón en las áreas de Ubaté y Cerrejón por medio de cromatografía de gases. Tesis de grado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander (UIS).

McInerney MJ, Sieber JR, Gunsalus RP. 2009. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. *Current Opinion in Biotechnology* 20:623–632.

Midgley DJ, Hendry P, Pinetown KL, Fuentes D, Gong S, Mitchell DL, Faiz M. 2010. Characterisation of a microbial community associated with a deep, coal seam methane reservoir in the Gippsland Basin, Australia. *International Journal of Coal Geology* 82:232-239.

Mikesell MD, Kukor JJ, Olsen RH. 1993. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradable* 4:249–259.

Opara A, Adams DJ, Free ML, McLennan J, Hamilton J. 2012. Microbial production of methane and carbon dioxide from lignite, bituminous coal, and coal waste materials. *International Journal of Coal Geology* 96/97:1-8.

Orem WH, Voytek MA, Jones EJ, Lerch HE, Bates AL, Corum MD, Warwick PD, Clark AC. 2010. Organic intermediates in the anaerobic biodegradation of coal to methane under laboratory conditions. *Organic Geochemistry* 41:997-1000.

Parkes RJ, Cragg BA, Wellsbury P. 2000. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeology Journal* 8:11-28.

Penner TJ, Foght JM, Budwill K. 2010. Microbial diversity of western Canadian subsurface coal beds and methanogenic coal enrichment cultures. *International Journal of Coal Geology* 82:81-93.

Polman JK, Breckenridge CR, Stoner DL, Andrews GF. 1995. Biologically derived value-added products from coal. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 54:249-255.

Quigley DR, Ward B, Crawford DL, Hatcher HJ, Dugan PR. 1989. Applied Biochemistry and Biotechnology 20/21:753-763.

Rice DD. 1993. Composition and origins of coalbed gas. In: Hydrocarbons from Coal, Chapter 7. The American Association of Petroleum Geologists Studies in Geology 38:159-184.

Rice CA, Flores RM, Stricker GD, Ellis MS. 2008. Chemical and stable isotopic evidence for water/rock interaction and biogenic origin of coalbed methane, Fort Union Formation, Powder River Basin, Wyoming and Montana U.S.A. International Journal of Coal Geology 76:76-85.

Scott AR, Kaiser WR, Ayers WB. 1994. Thermogenic and secondary biogenic gases, San Juan Basin, Colorado and New Mexico: Implications for coalbed gas producibility. The American Association of Petroleum Geologists Bulletin 78:1186-1209.

Scott AR, Zhou N, Levine JR. 1995. A Modified Approach to Estimating Coal and Coal Gas Resources: Example from the Sand Wash Basin, Colorado. The American Association of Petroleum Geologists 79(9):1320-1336.

Shimizu S, Akiyama M, Naganuma T, Fujioka M, Nako M, Ishijima Y. 2007. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. Geobiology 5:423-433.

Smith JW, Pallaser RJ. 1996. Microbial Origin of Australian Coalbed Methane. The American Association of Petroleum Geologists 80(6):891-897.

Solano-Acosta W, Schimmelmann A, Mastalerz M, Arango I. 2008. Diagenetic mineralization in Pennsylvanian coals from Indiana, USA: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ implications for cleat origin and coalbed methane generation. International Journal of Coal Geology 73:219-236.

StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system). Version 6. www.statsoft.com.

Strandberg GW, Lewis SN. 1987. Solubilization of coal by an extracellular product from *Streptomyces setonii* 75Vi2. Journal of Industrial Microbiology 1:371-375.

Strapoć D, Mastalerz M, Eble C, Schimmelmann A. 2007. Characterization of the origin of coalbed gases in southeastern Illinois Basin by compound-specific carbon and hydrogen stable isotope ratios. Organic Geochemistry 38:267-287.

Tang YQ, Ji P, Lai GL, Chi CQ, Liu ZS, Wu XL. 2012. Diverse microbial community from the coalbeds of the Ordos Basin, China. International Journal of Coal Geology 90/91:21–33.

Tao M, Wang W, Xie G, Li J, Wang Y, Zhang X, Zhang H, Shi B, Gao B. 2005. Secondary biogenic coalbed gas in some coal fields of China. *Chinese Science Bulletin* 50:24-29.

Ulrich G, Bower S. 2008. Active methanogenesis and acetate utilization in Powder River Basin coals, United States. *International Journal of Coal Geology* 76:25-33.

Volkwein JC, Schoeneman AL, Clausen EG, Gaddy JL, Johnson ER, Basu R, Ju N, Klasson KT. 1994. Biological production of methane from bituminous coal. *Fuel Processing Technology* 40:339-345.

Wang A, Qin Y, Wu Y, Wan B. 2010. Status of research on biogenic coalbed gas generation mechanisms. *Mining Science and Technology* 20:271-275.

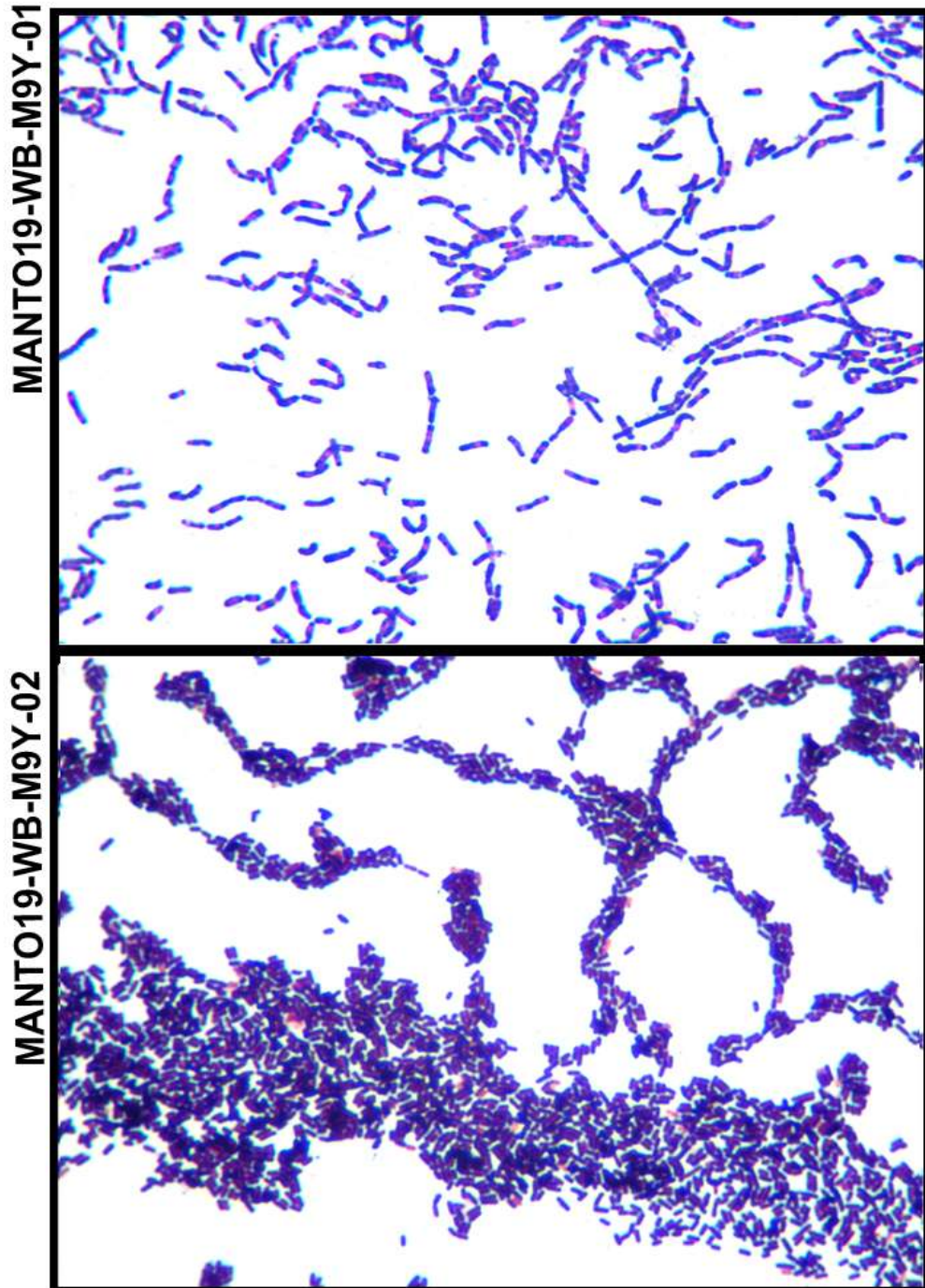
Wani AA, Surakasi VP, Siddharth J, Raghavan RG, Patole MS, Ranade D, Shouche YS. 2006. Molecular analyses of microbial diversity associated with the Lonar soda lake in India: an impact crater in a basalt area. *Research in Microbiology* 57:928-937.

Ward JA, Slater GF, Moser DP, Lin L-H, Lacrampe-Couloume G, Bonin AS, Davidson M, Hall JA, Mislowack B, Bellamy RES, Onstott TC, Lollar BS. 2004. Microbial hydrocarbon gases in the Witwatersrand Basin, South Africa: Implications for the deep biosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68 (15):3239-3250.

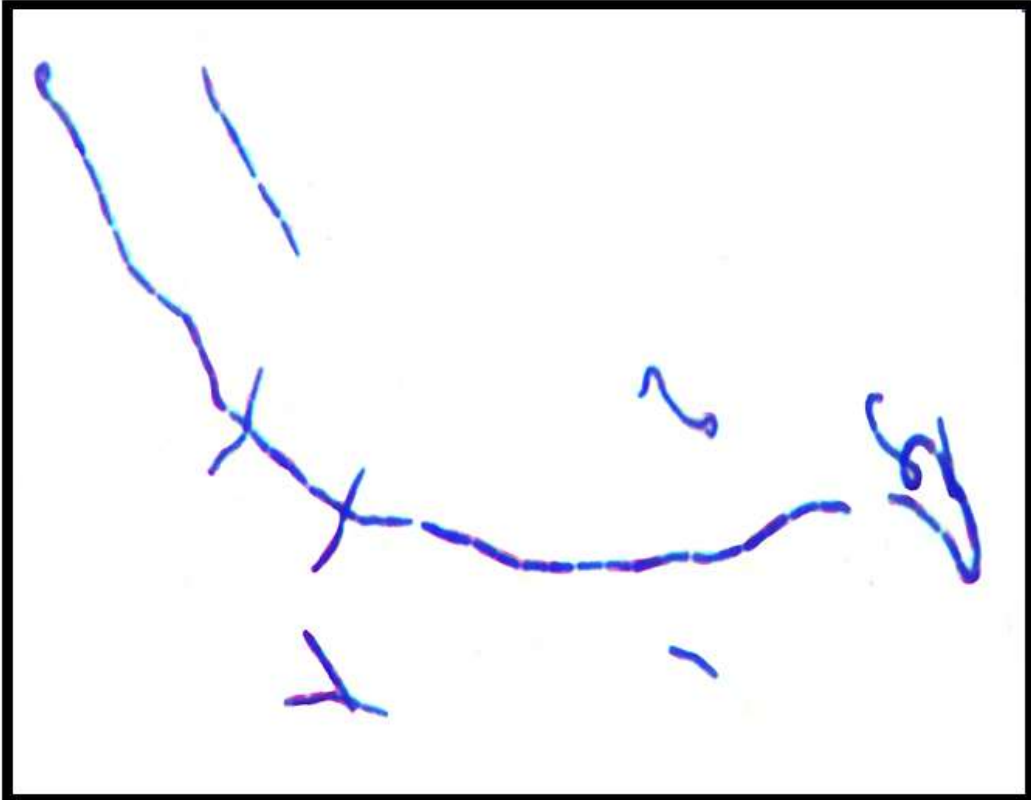
Warwick PD, Breland FC, Hackley PC. 2008. Biogenic origin of coalbed gas in the northern Gulf of Mexico coastal plain, USA. *International Journal of Coal Geology* 76:119-137.

ANEXOS

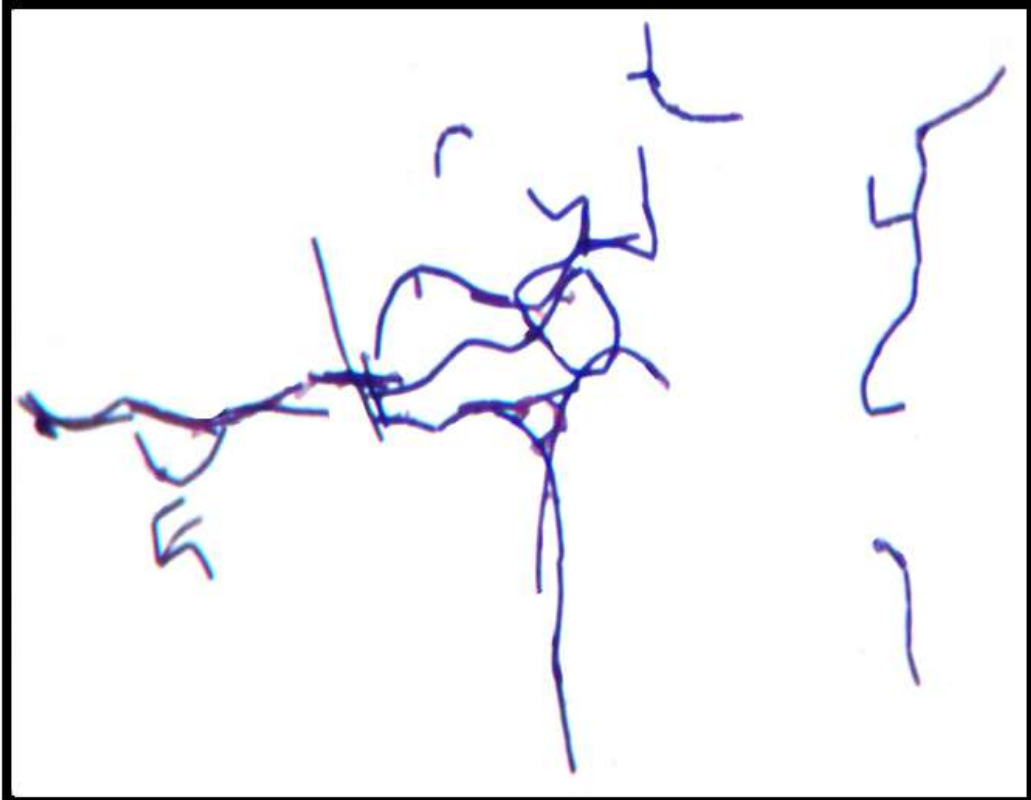
Anexo 1. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de la zona de muestreo.



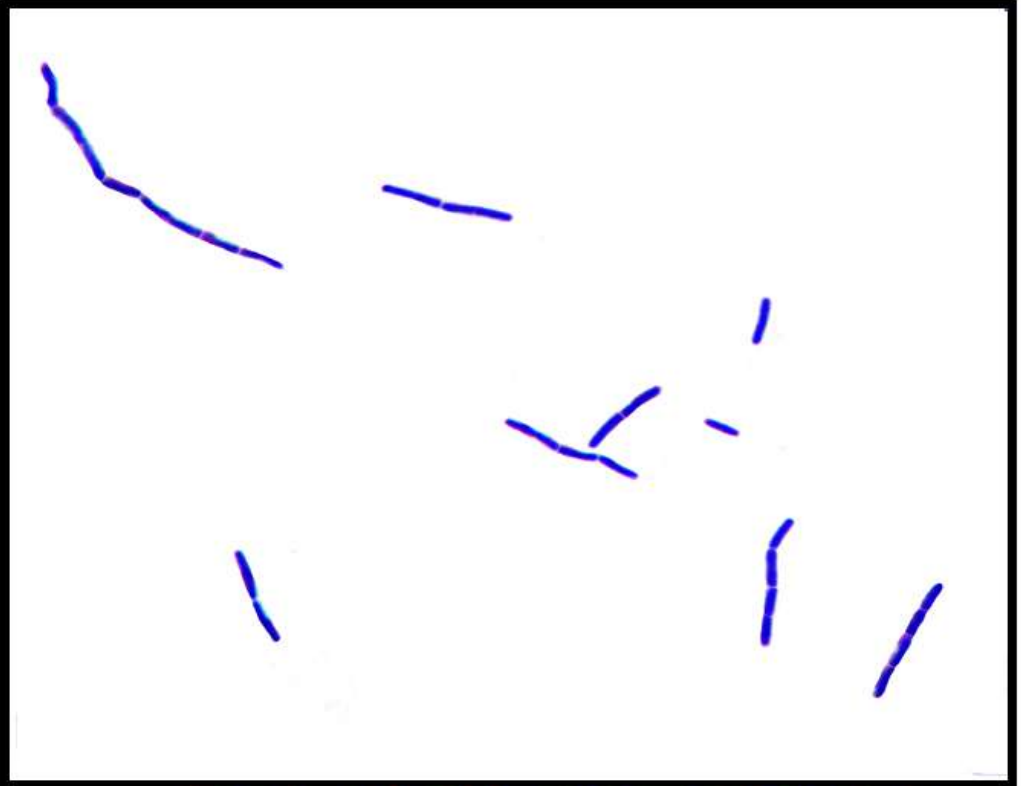
MANTO19-WB-M9YAc-03



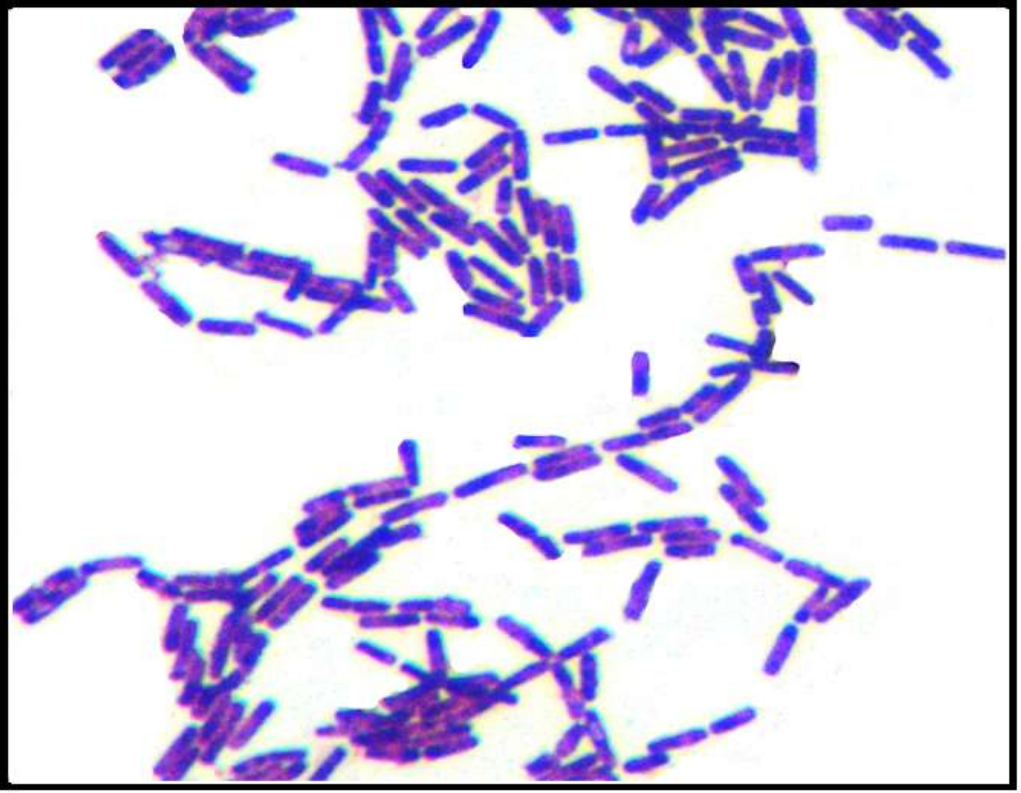
MANTO19-WB-M9YGlu-04



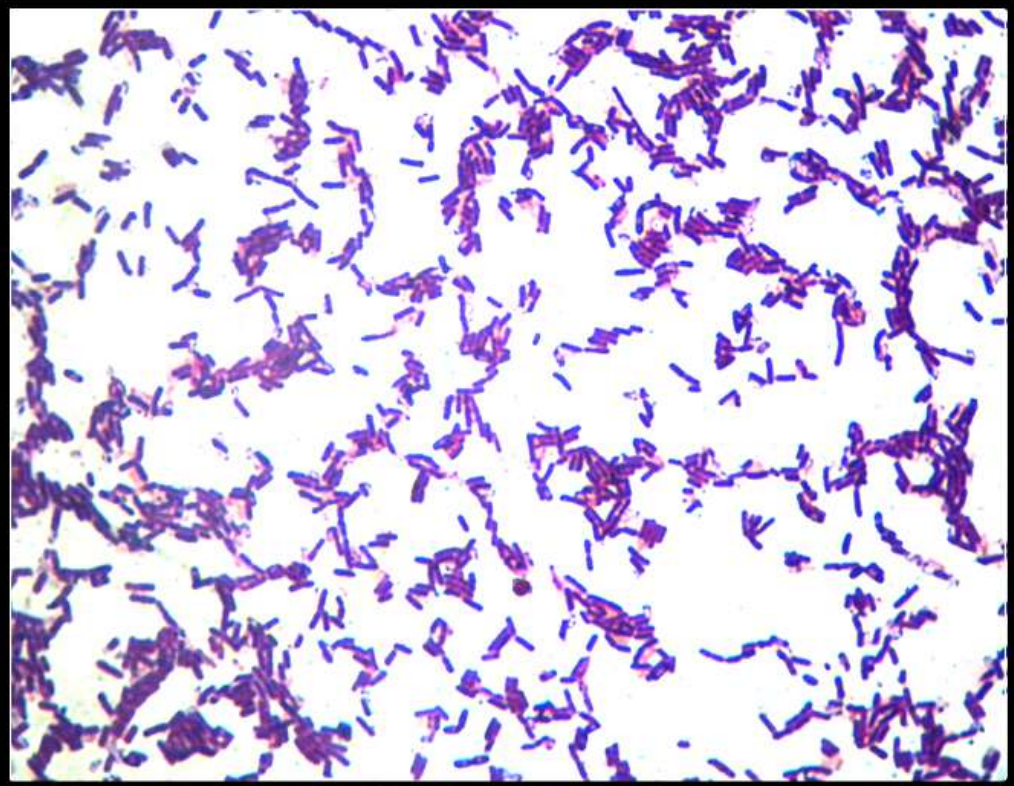
MANTO19-WB-M9YAc-05



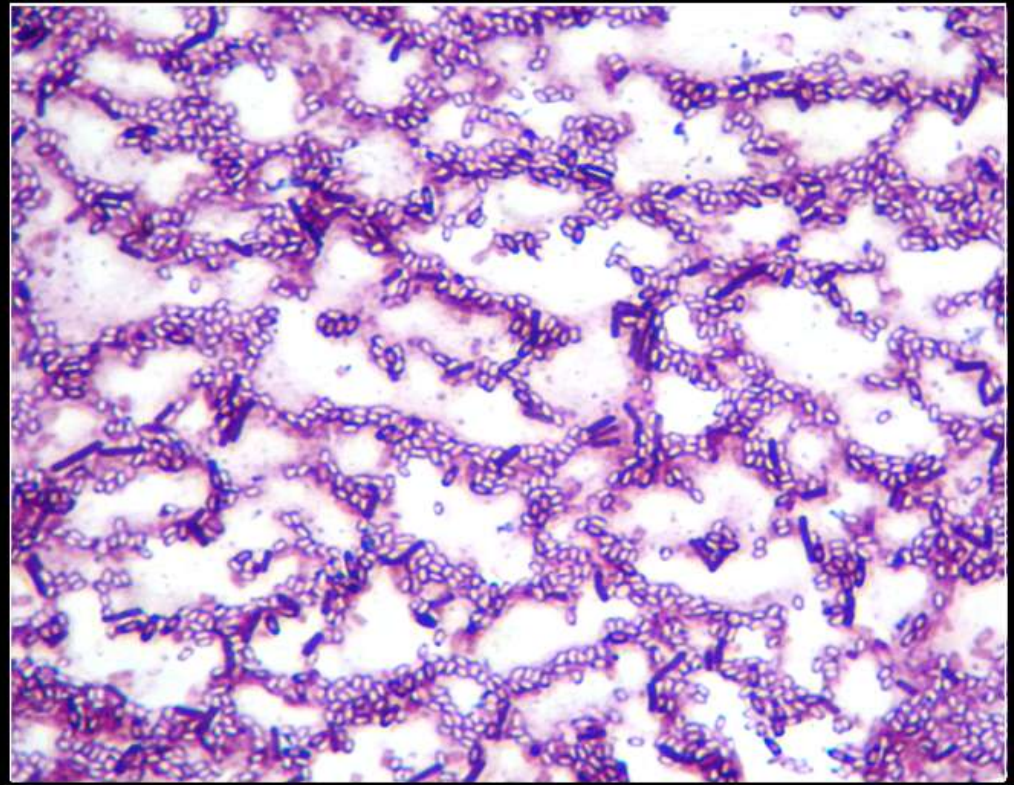
MANTO19-WB-M9YAc-06



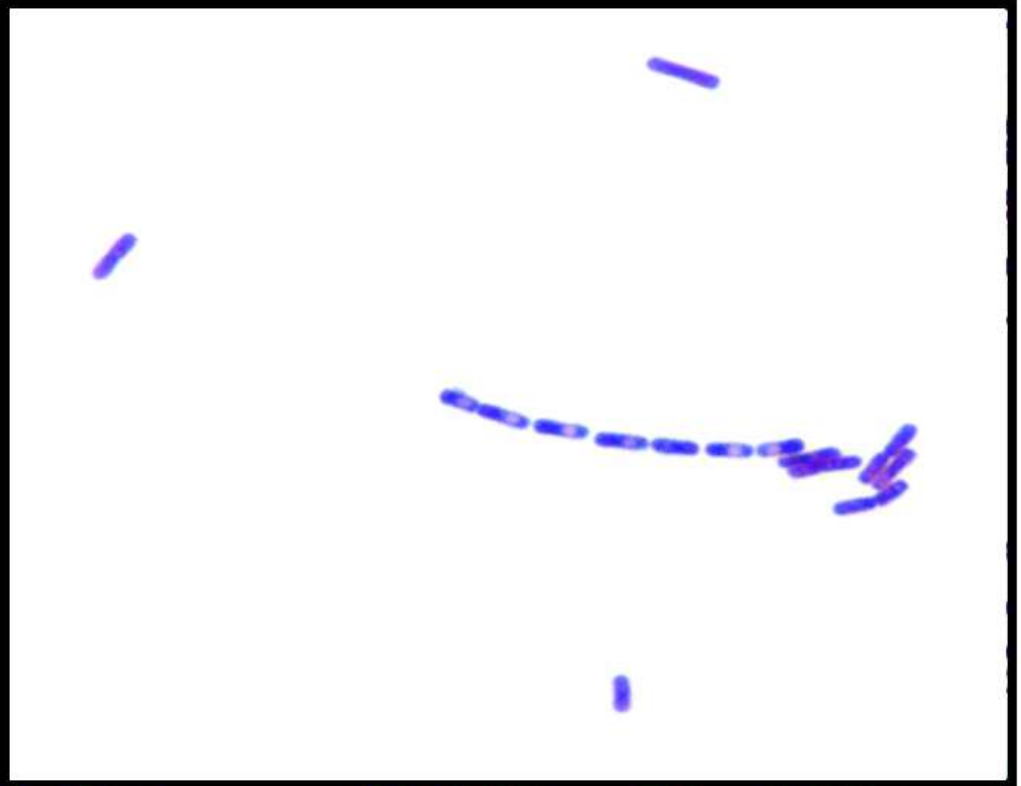
MANTO19-WB-M9YAC-07



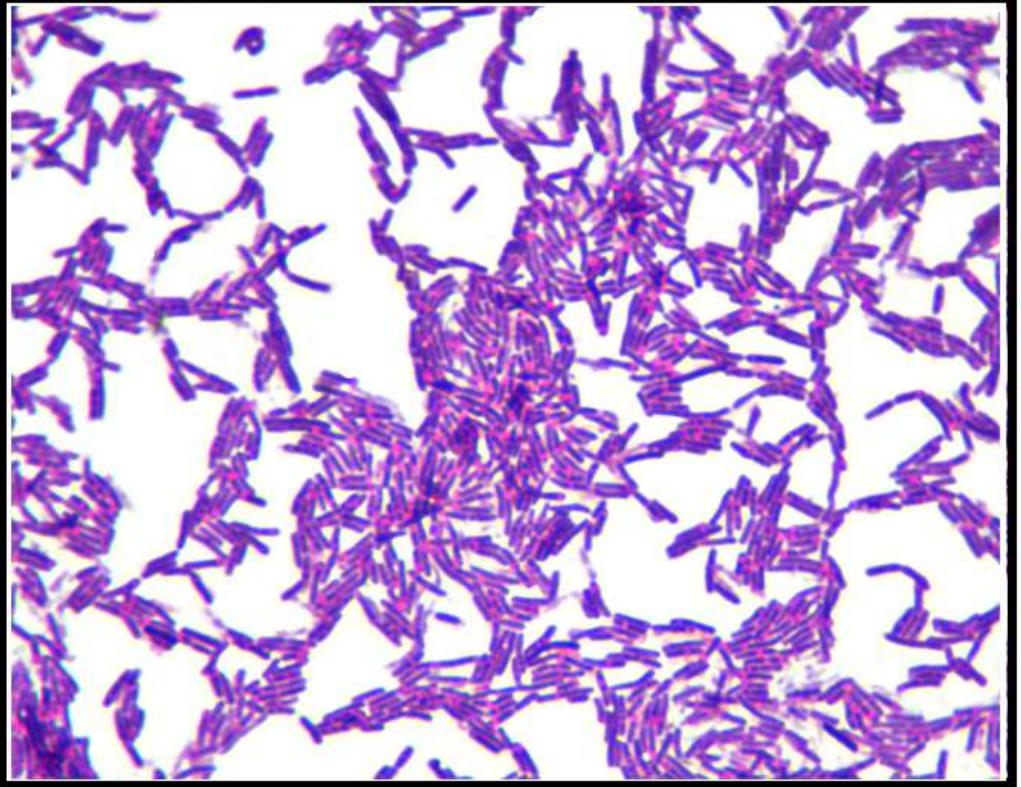
MANTO19-WB-M9YAC-08



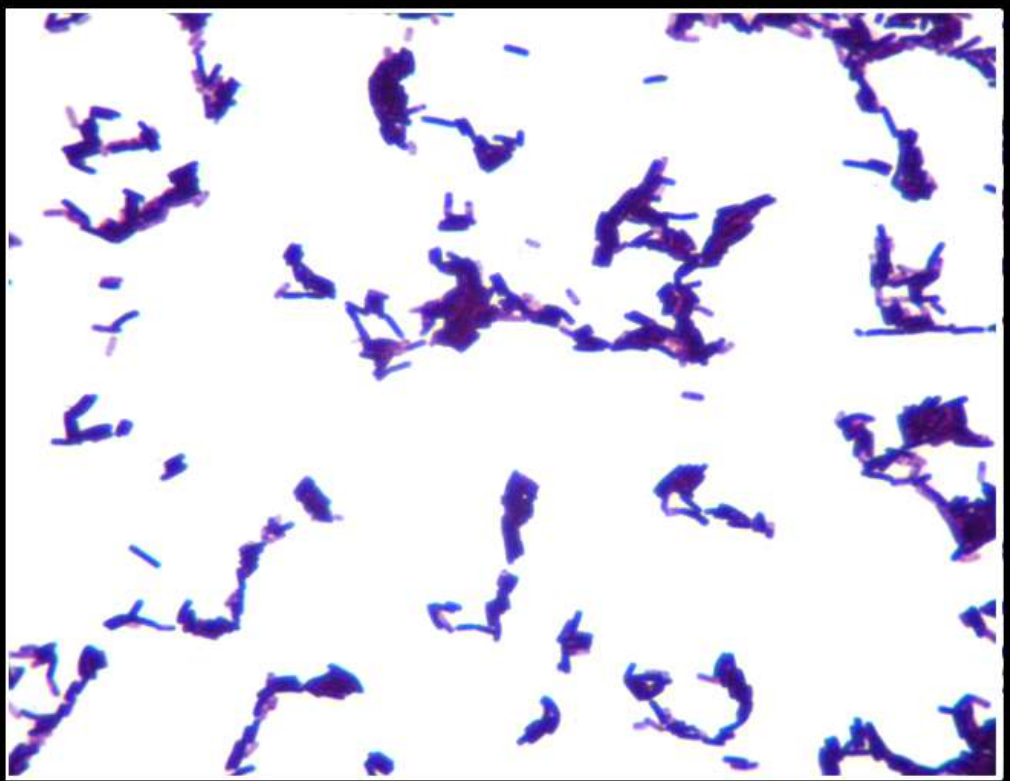
MANTO19-WB-M9YAc-09



MANTO19-WB-M9YAc-10



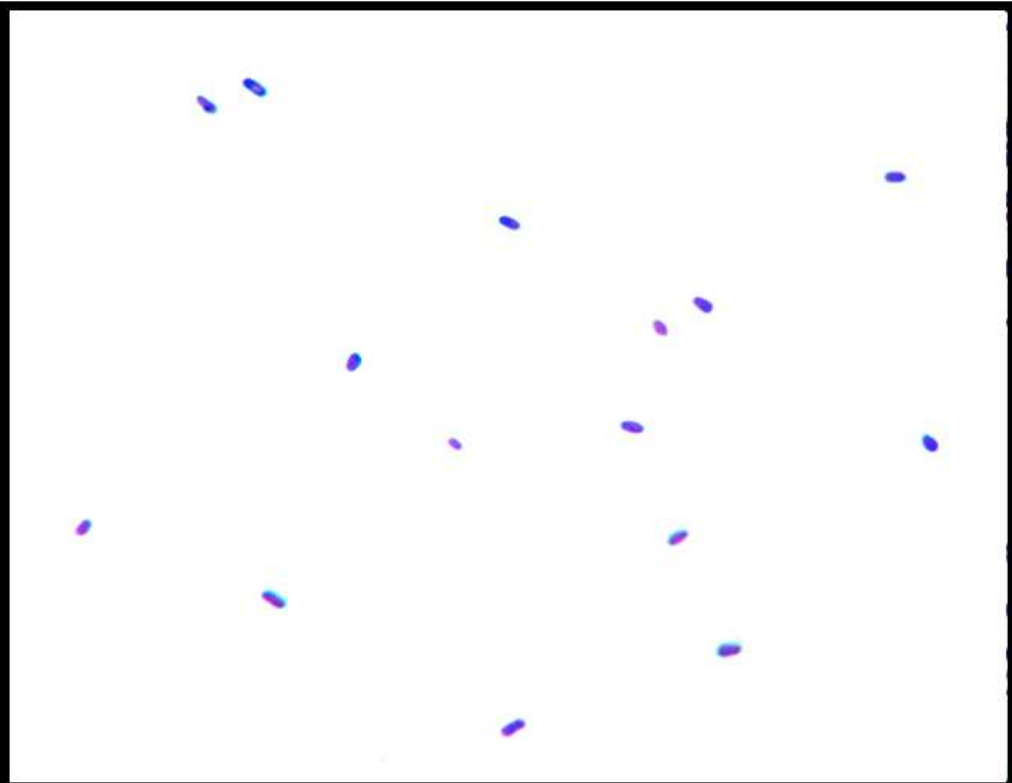
MANTO19-WB-M9YAc-11



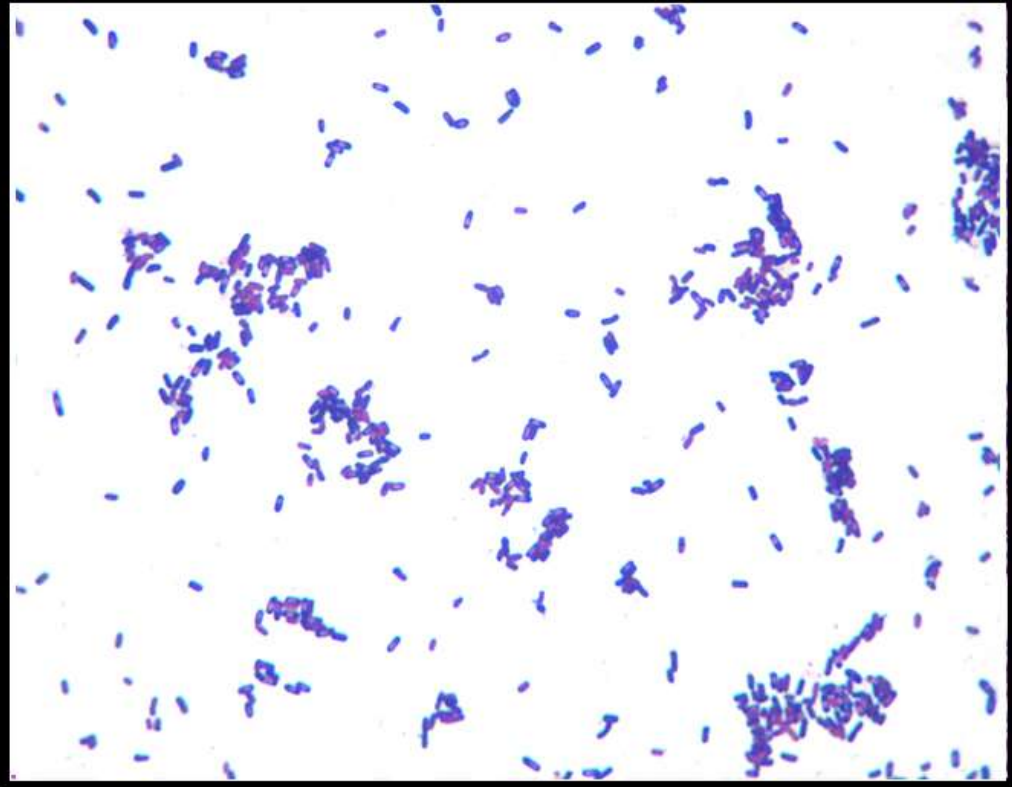
MANTO19-WB-M9YAc-12



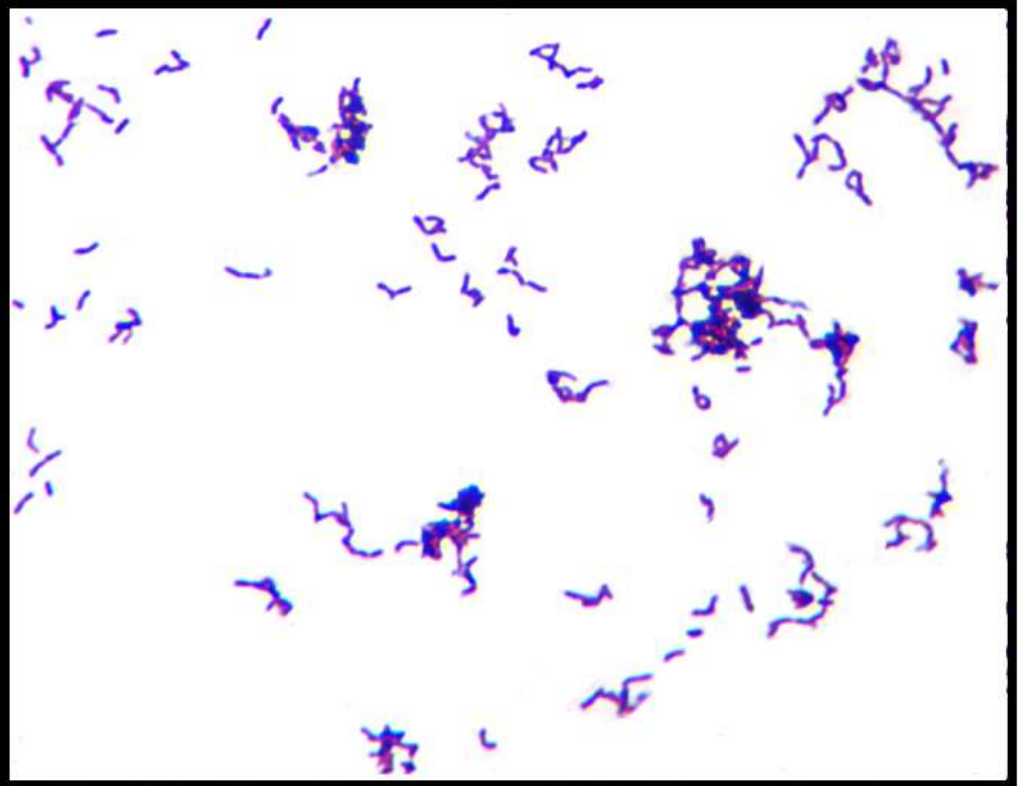
MANTO11-WB-M9YGly-13



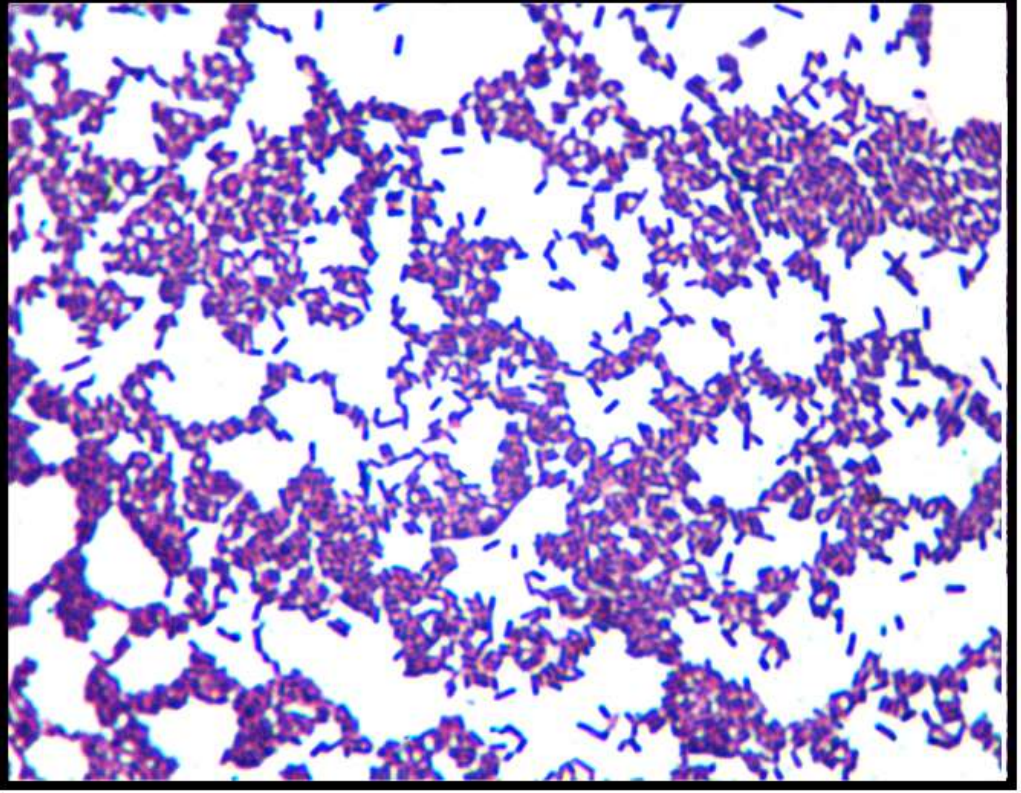
MANTO11-WB-M9YEt-14



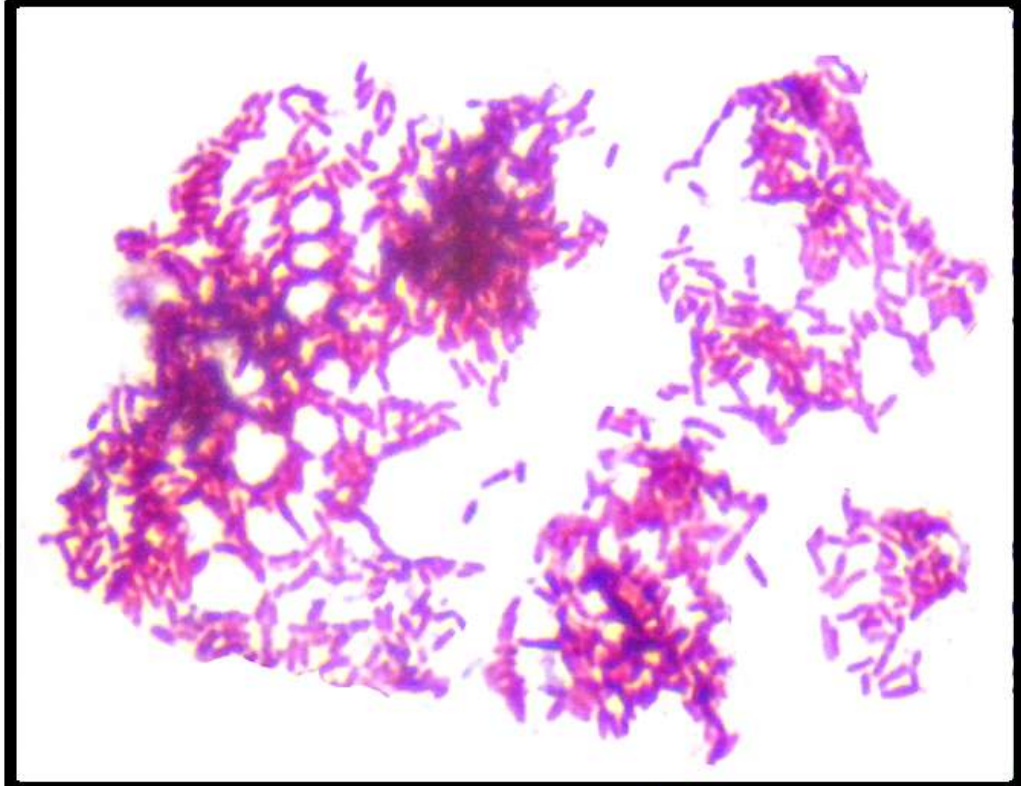
MANTO18-WB-RCM-15



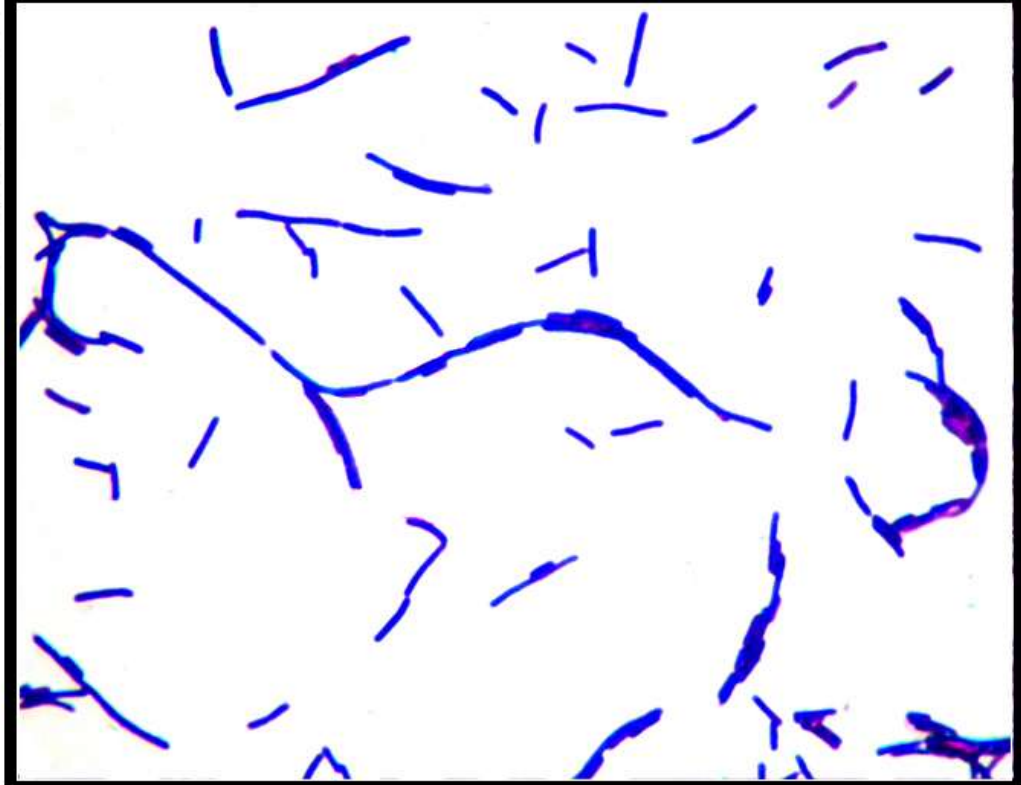
MANTO19-WB-M9YAc-16



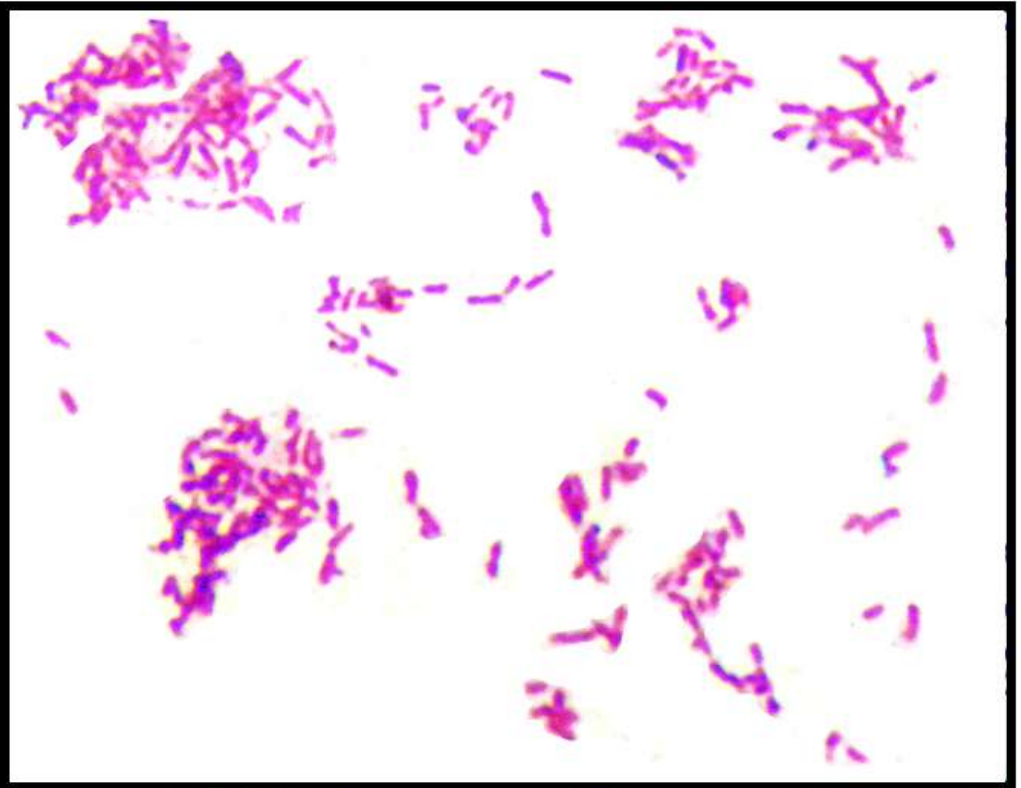
MANTO11-WB-M9YGly-17



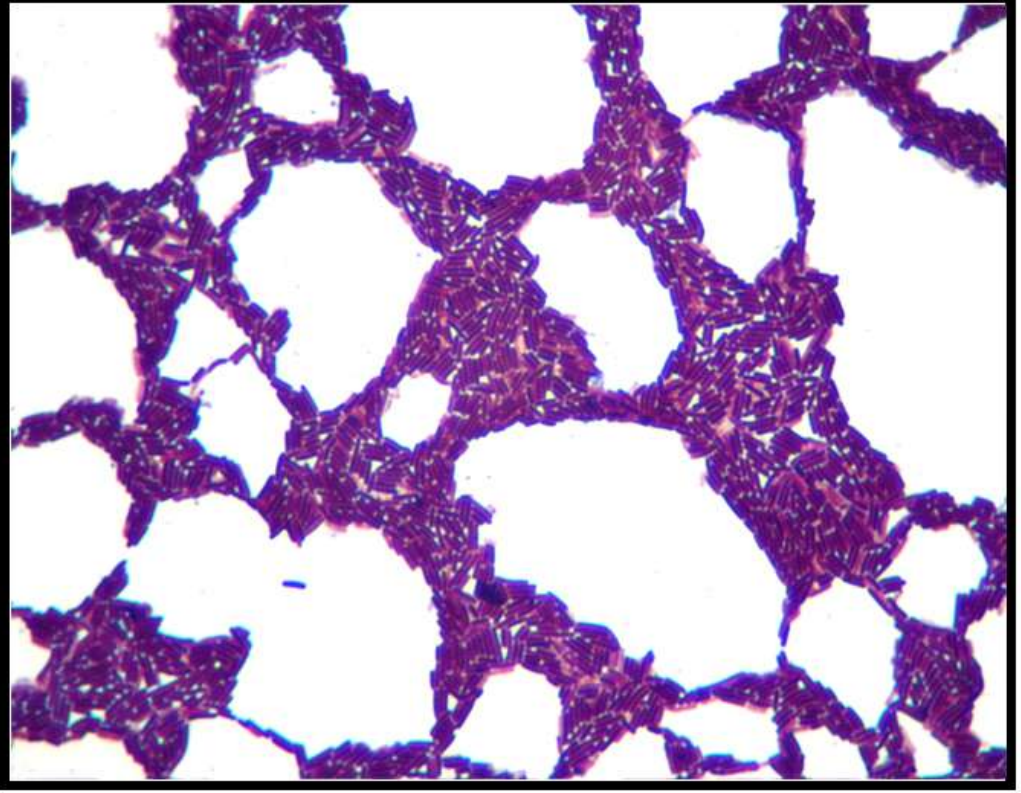
MANTO19-WB-M9YAc-18



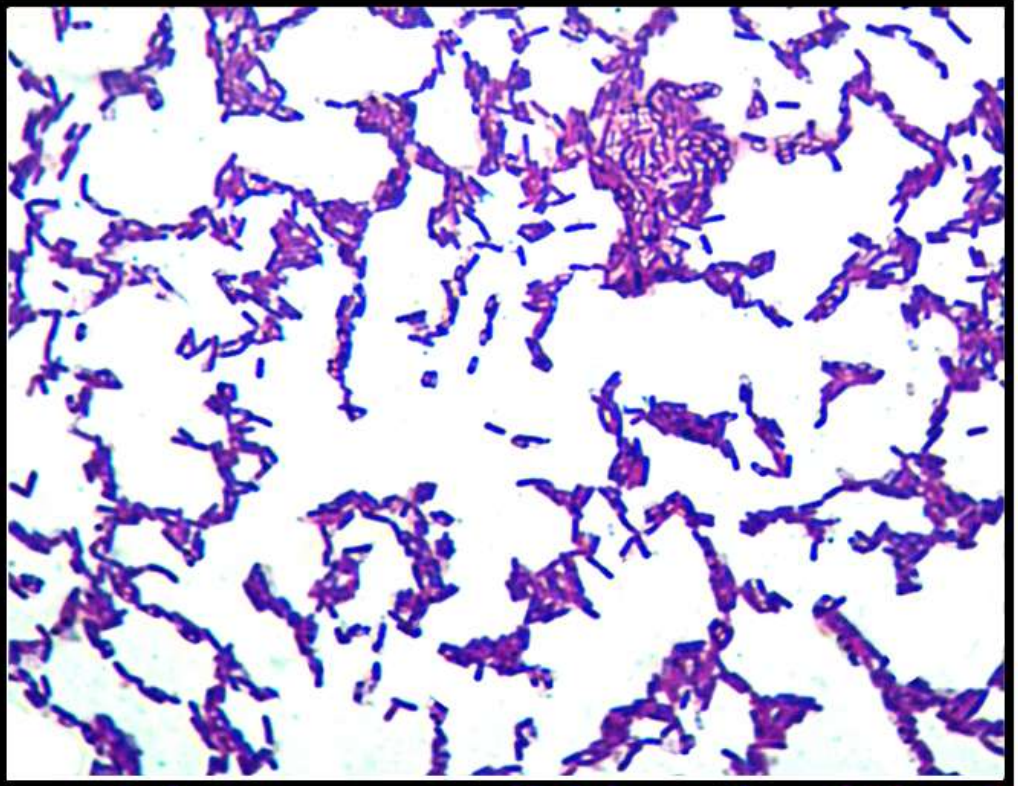
MANTO11-WB-M9Y Gly-19



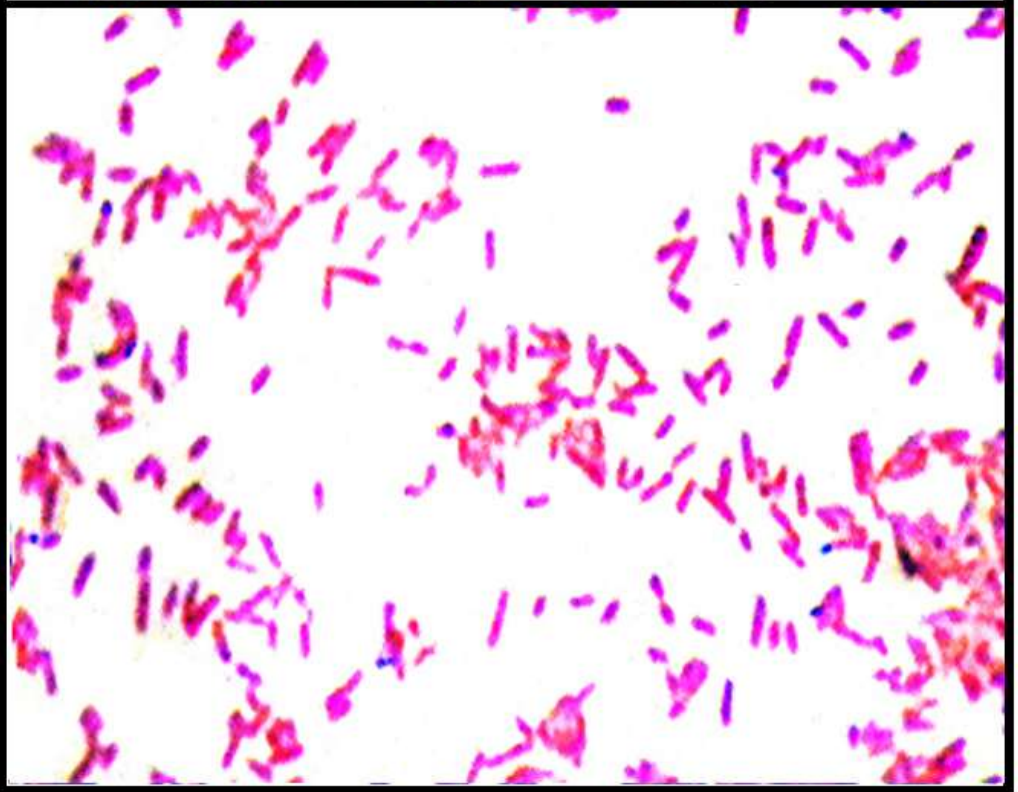
MANTO19-WB-M9Y Ac-20



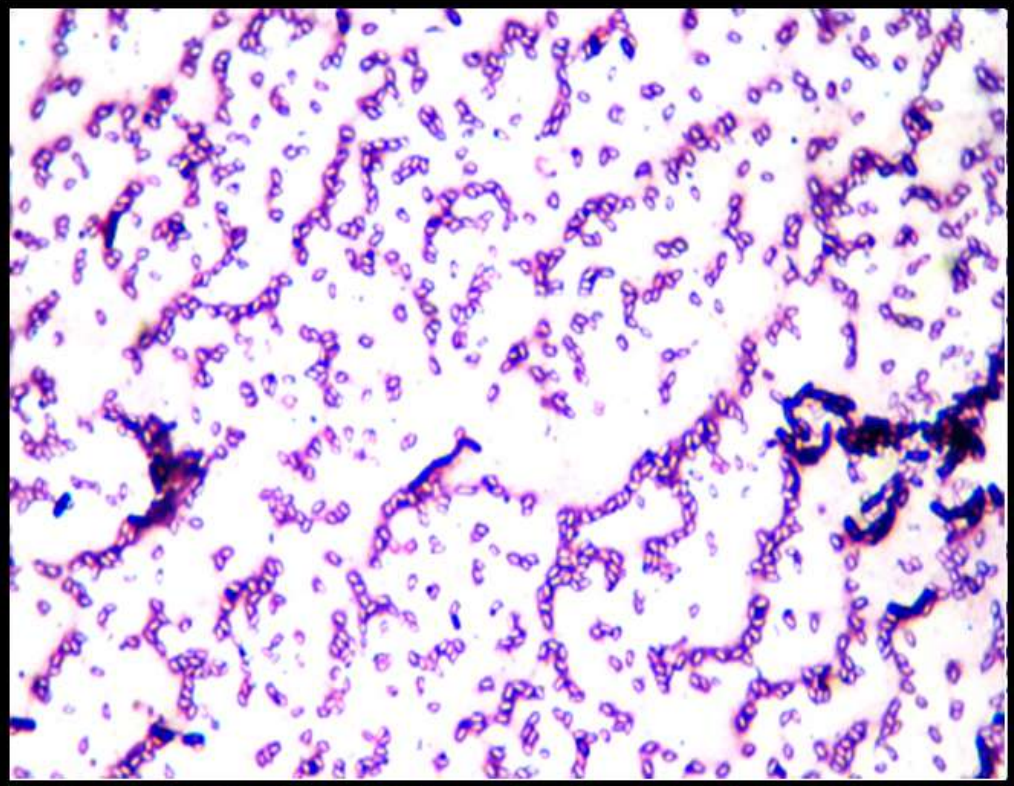
MANTO19-WB-M9YAc-21



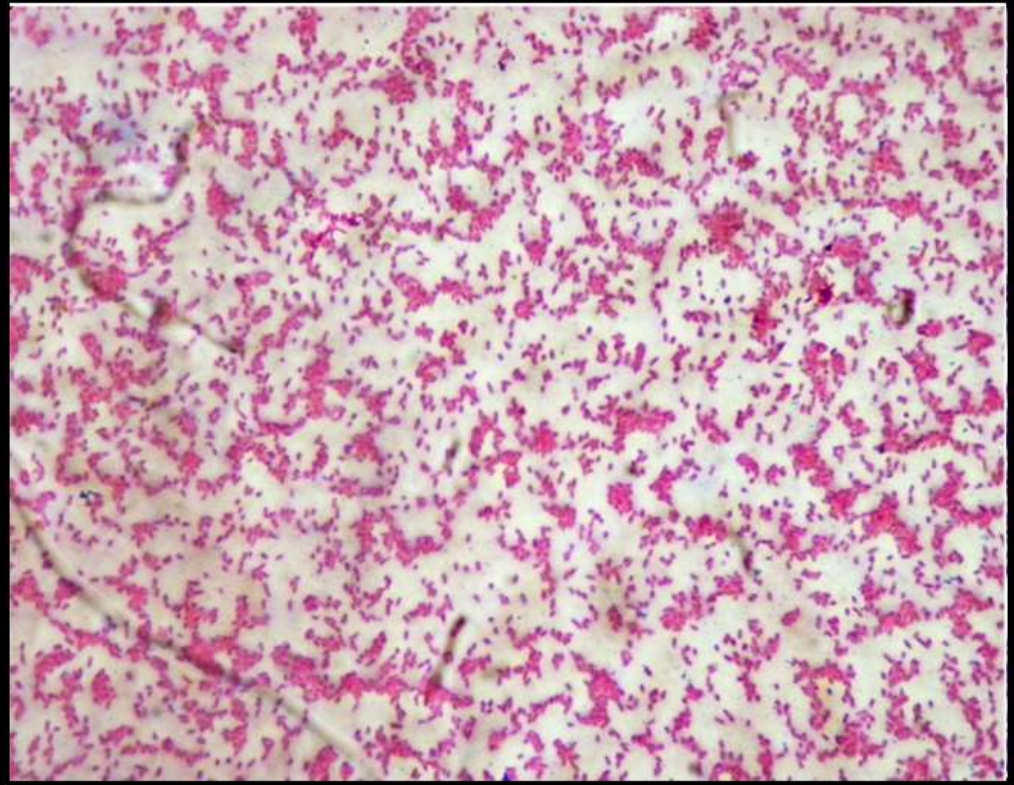
MANTO11-WB-M9YEt-22



MANTO19-WB-M9YAc-23



MANTO11-WB-M9YGly-24



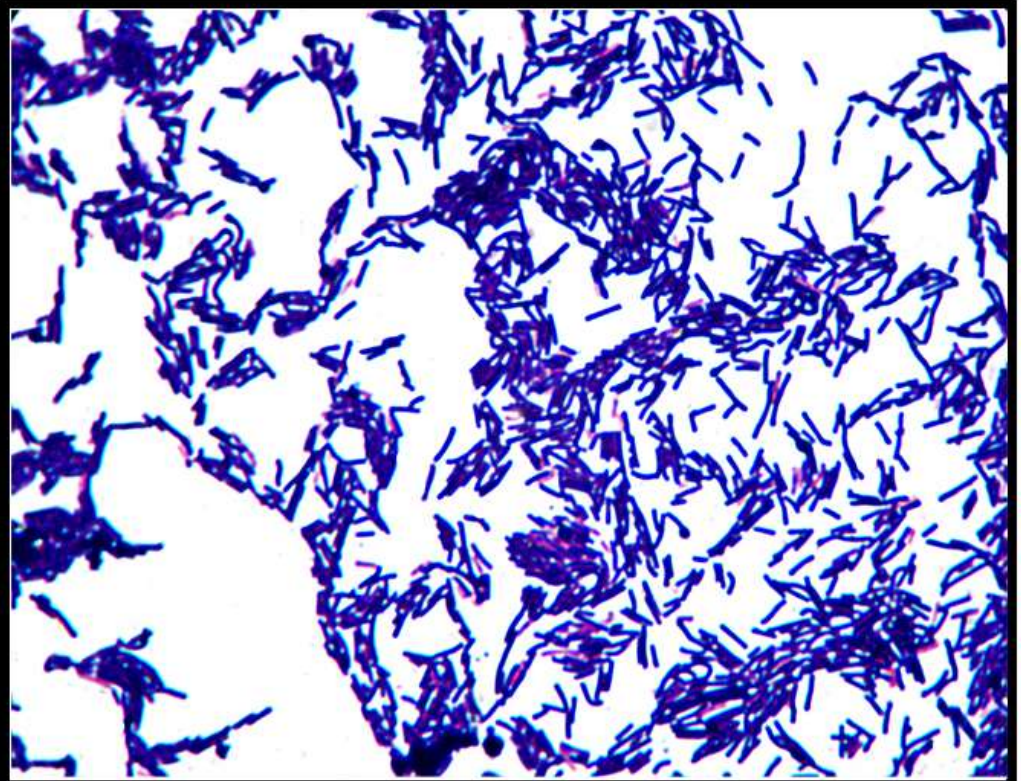
MANTO11-WB-M9Y-25



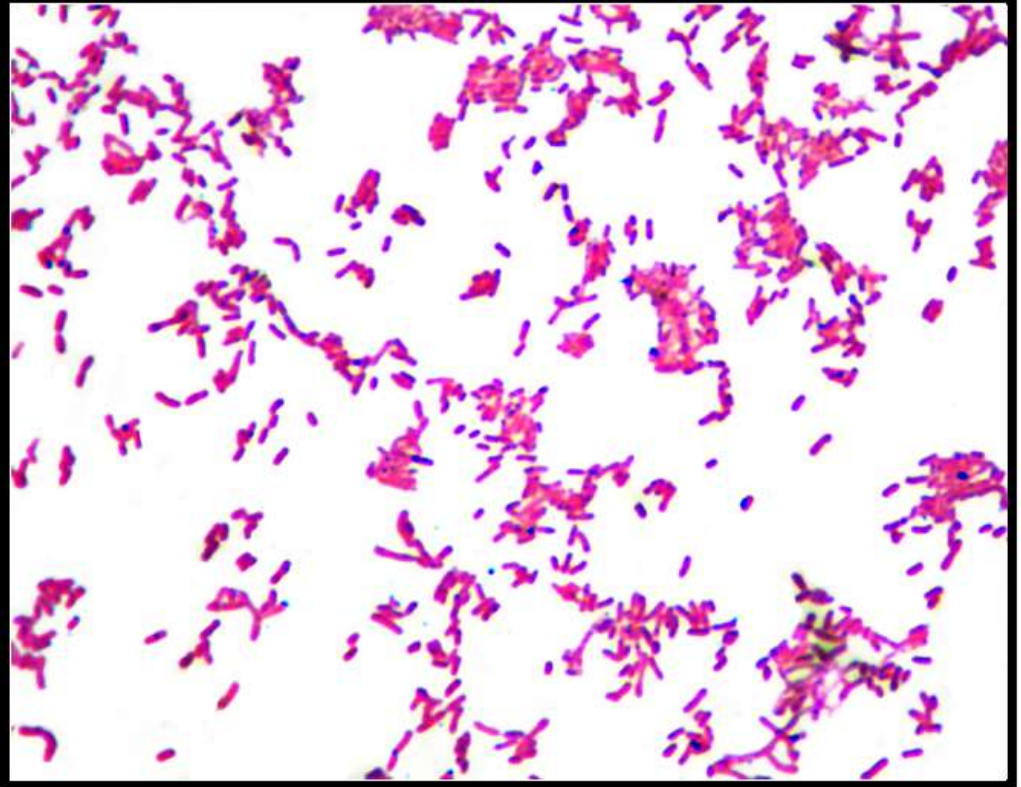
MANTO19-WB-M9Y-26



MANTO12-WB-M9YGly-27



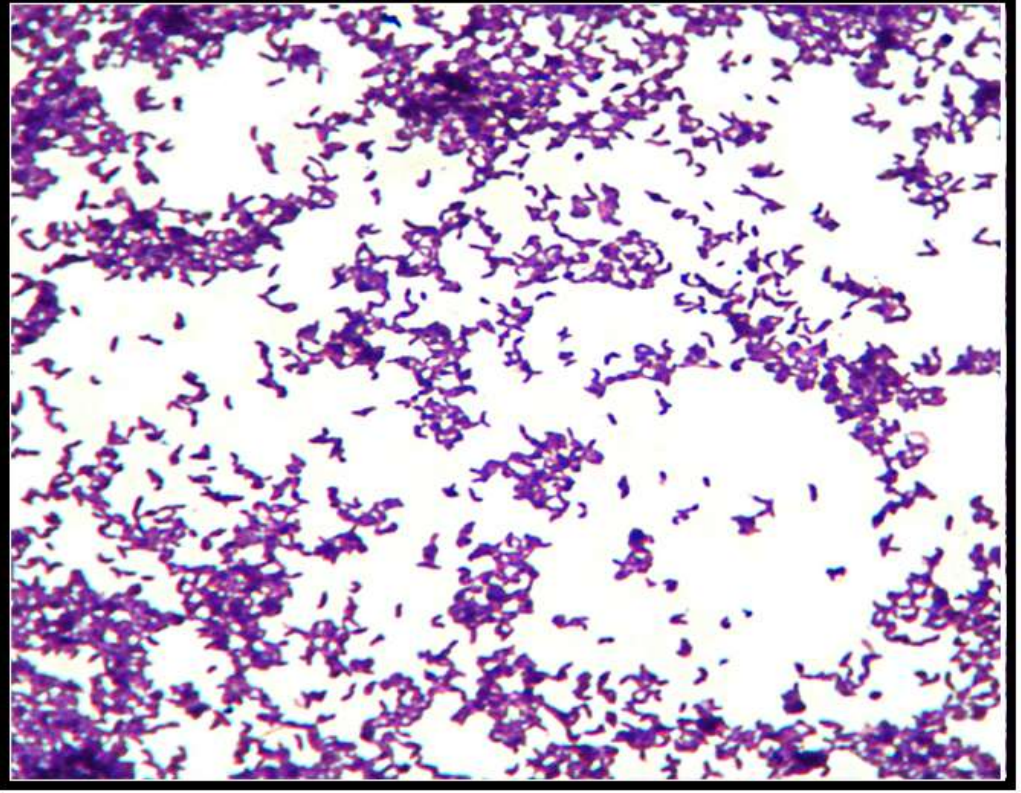
MANTO11-WB-M9YGly-28



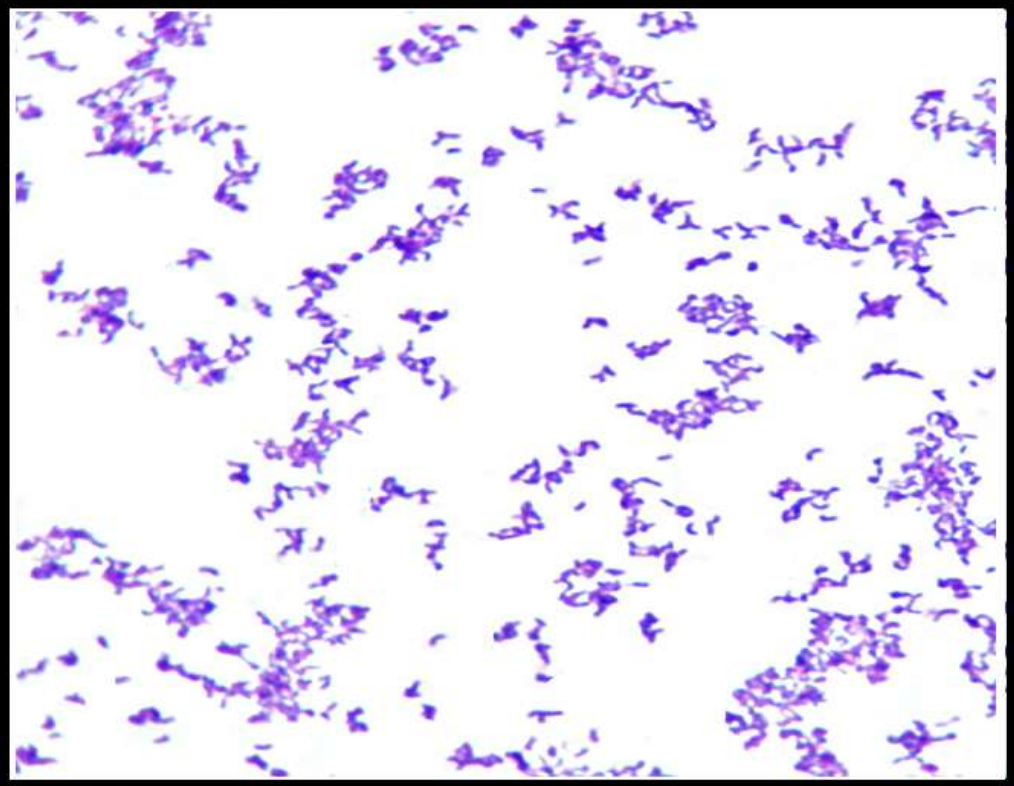
MANTO5-WB-M9Y-29



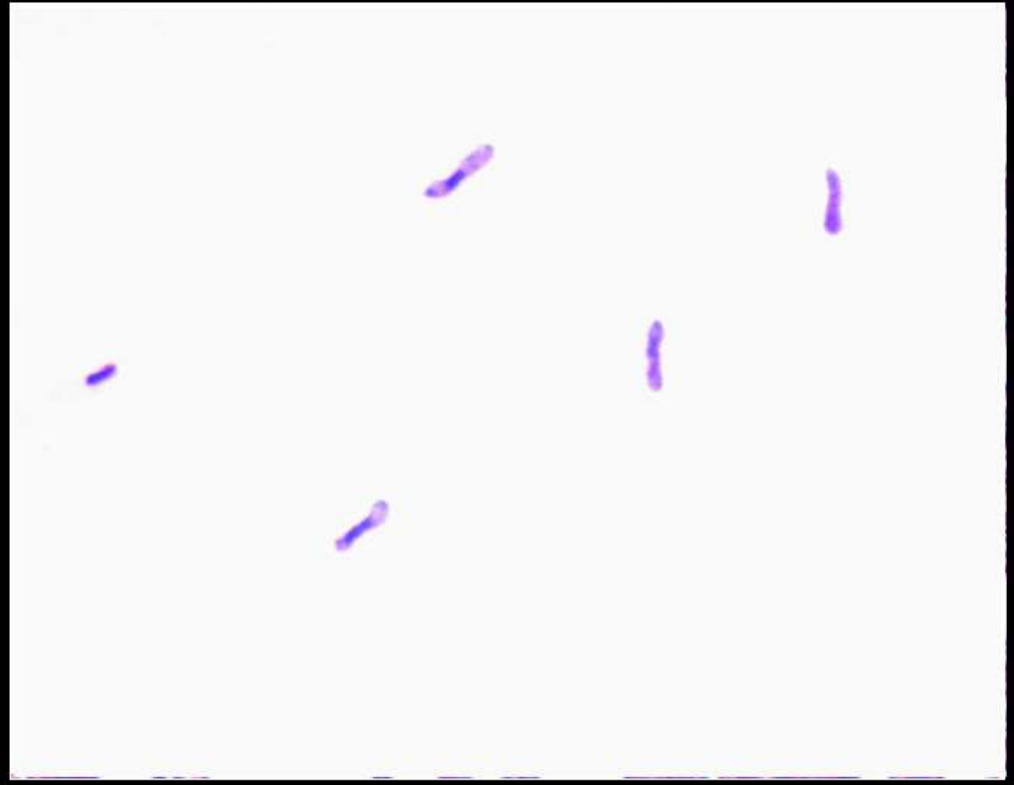
MANTO18-WB-RCM-30



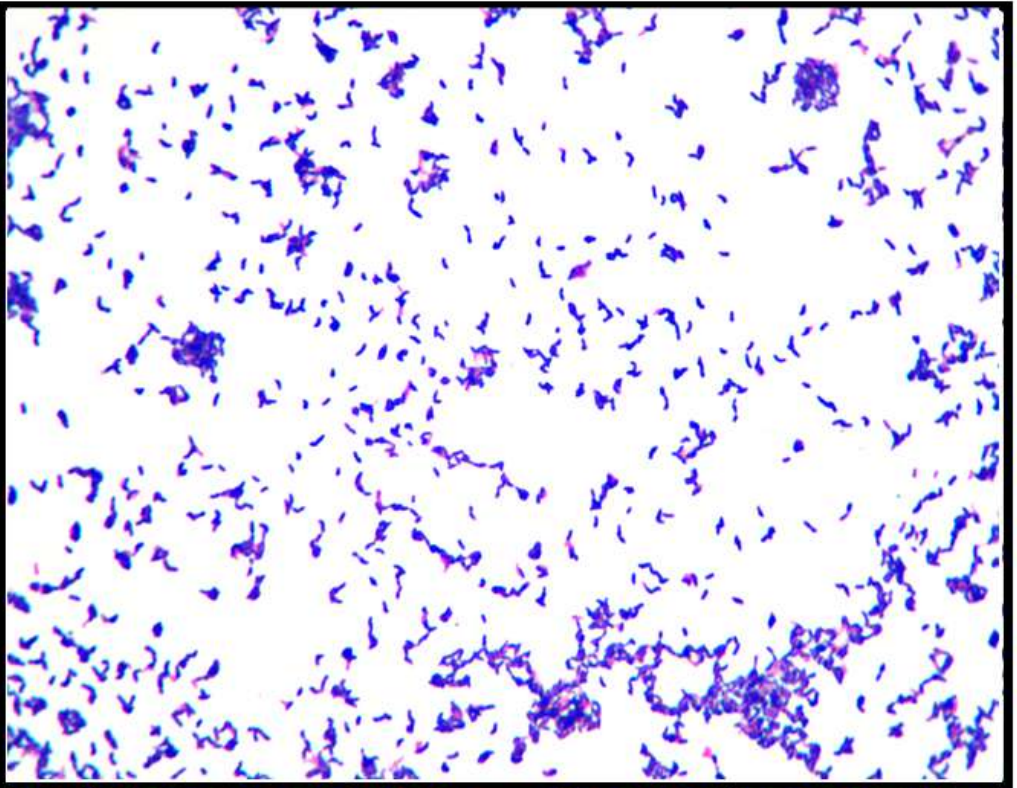
MANTO18-WB-RCM-31



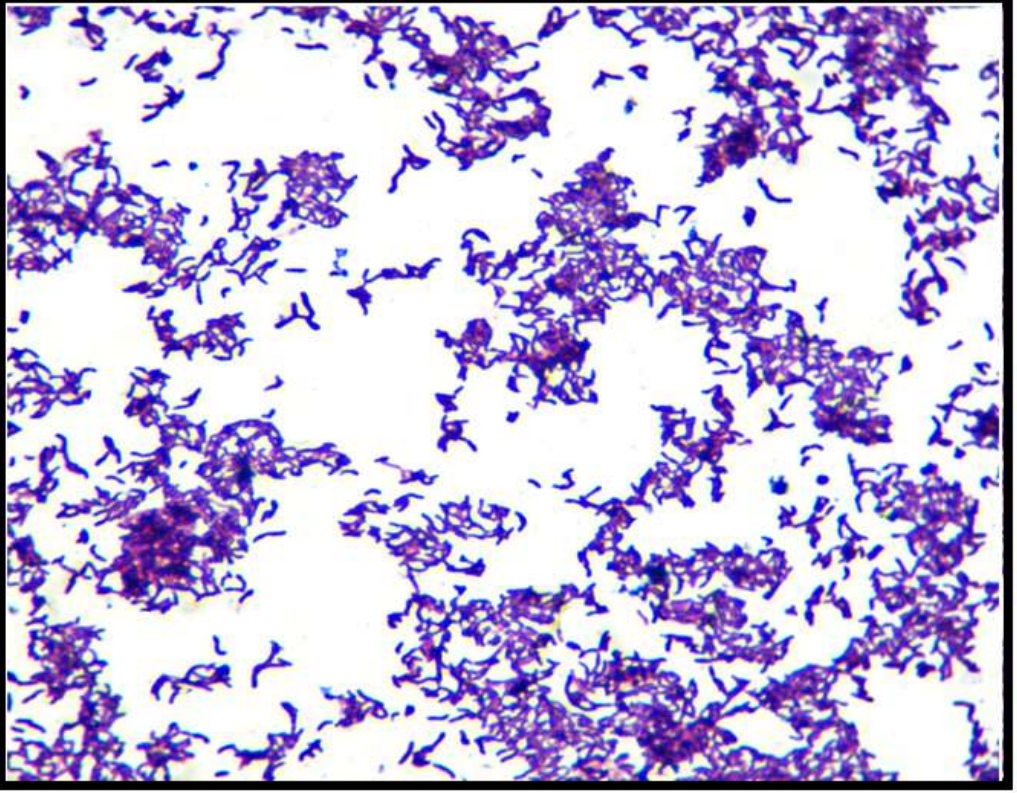
MANTO18-WB-RCM-32



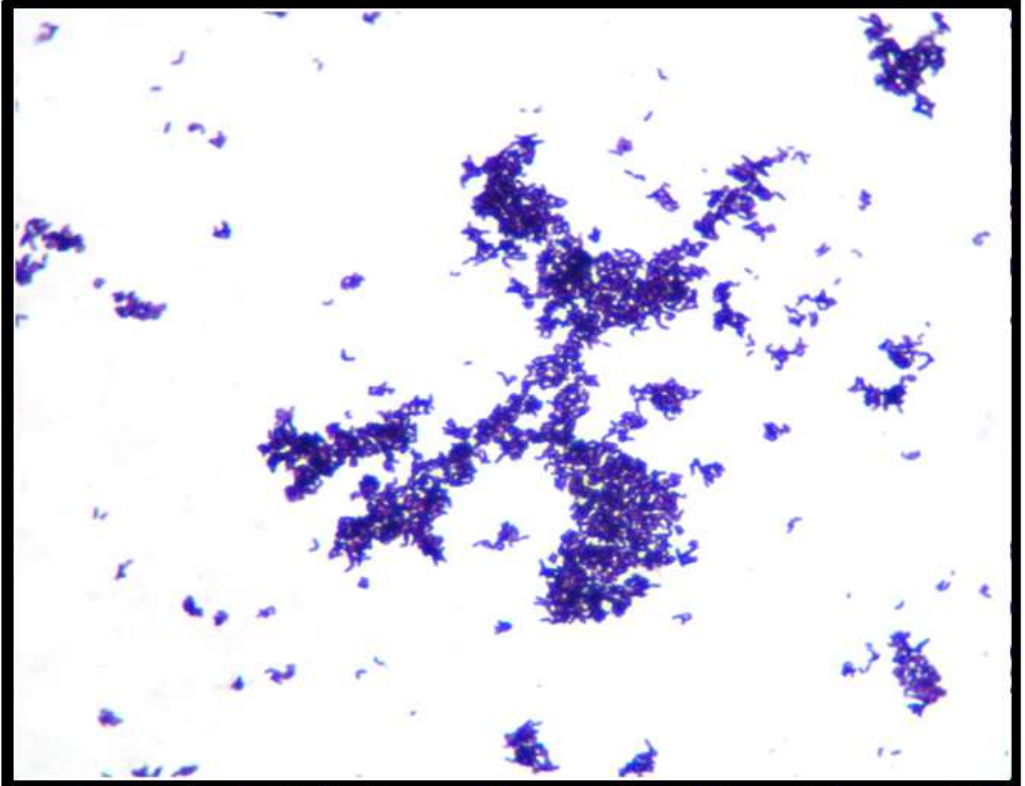
MANTO18-WB-RCM-33



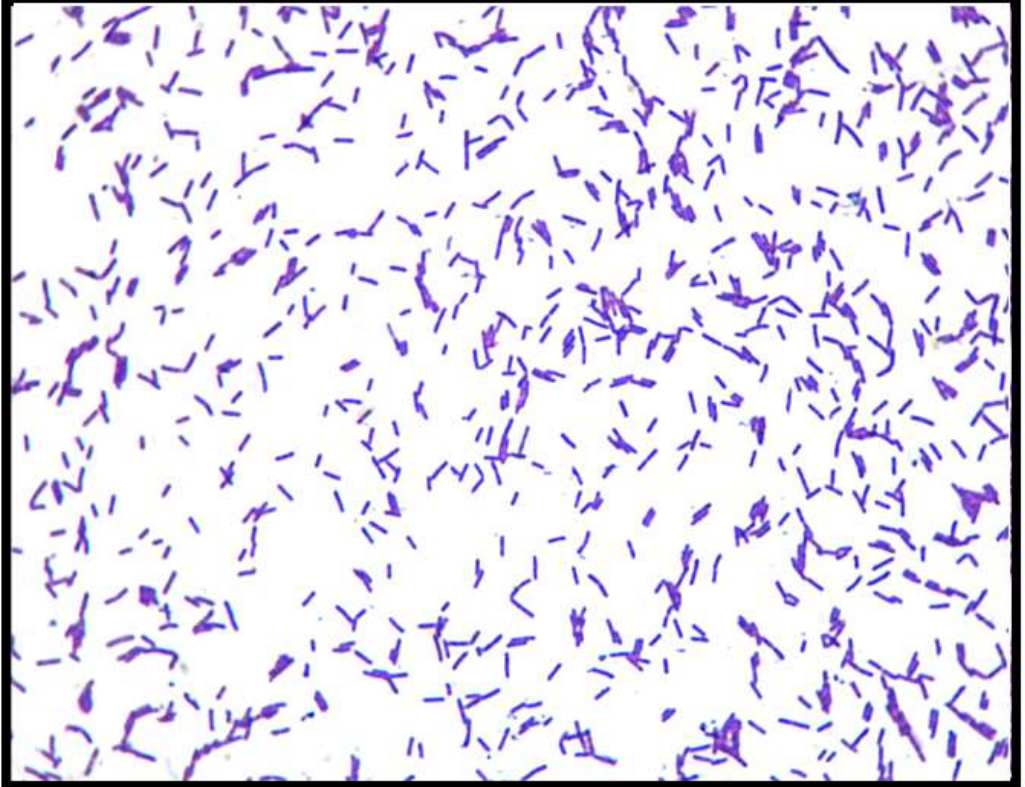
MANTO18-WB-RCM-34



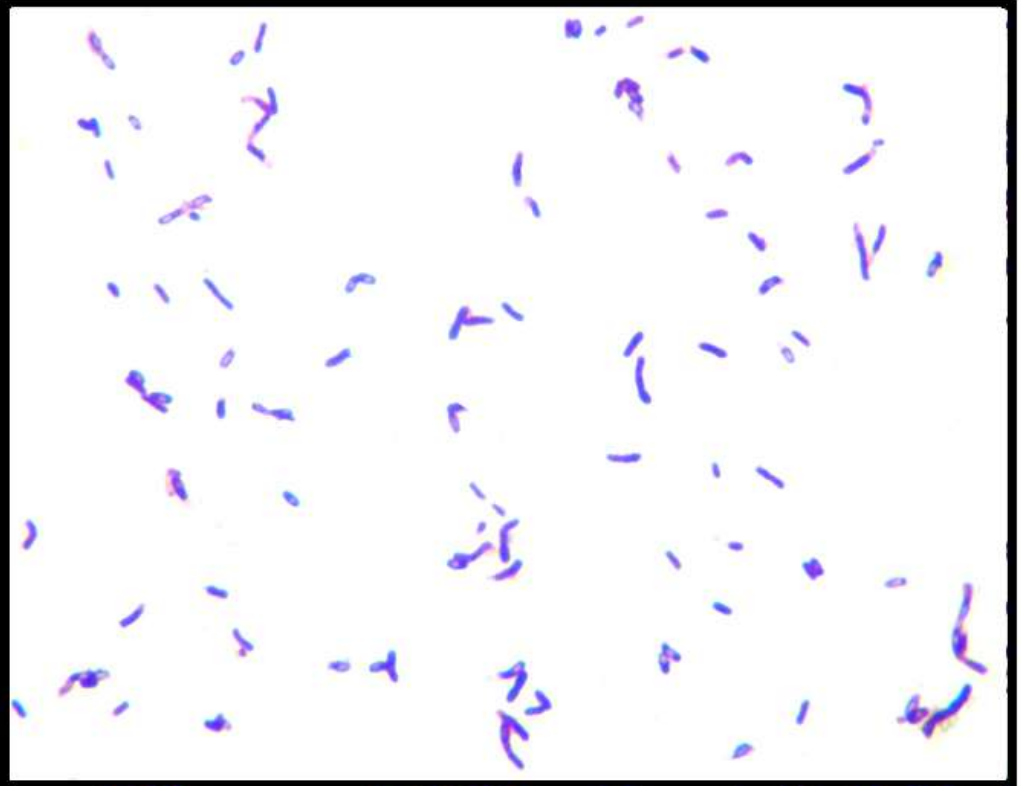
MANTO1-CB-M9YAc-01



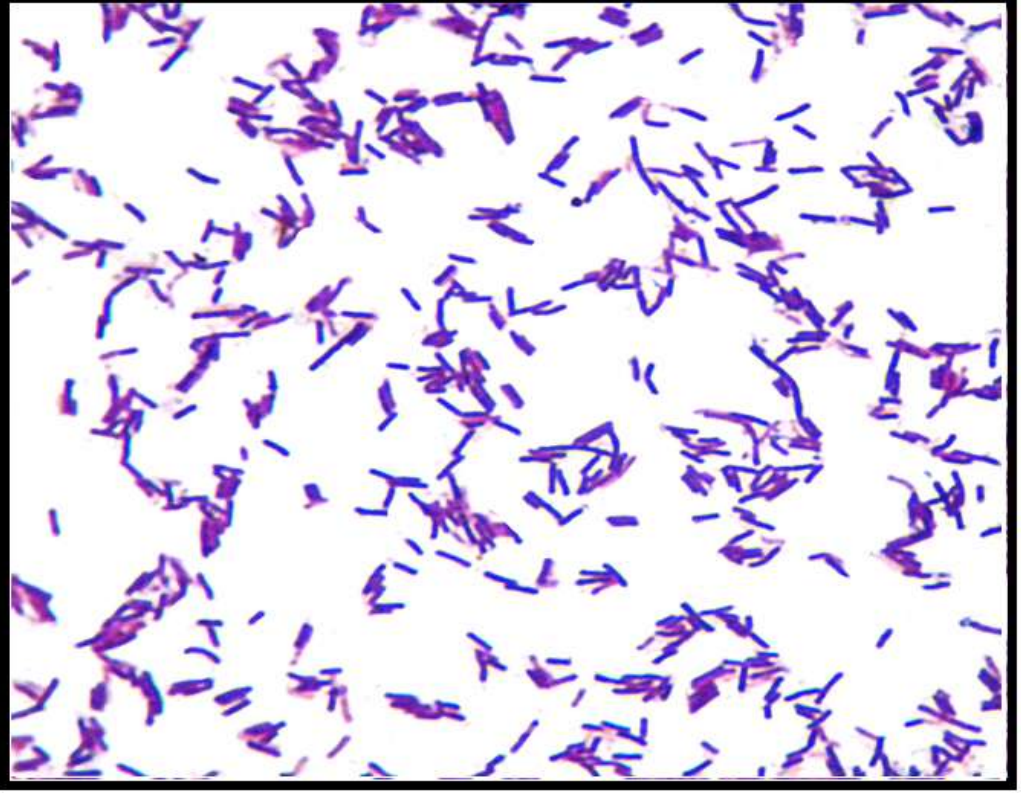
MANTO7ET-CB-M9YAc-02



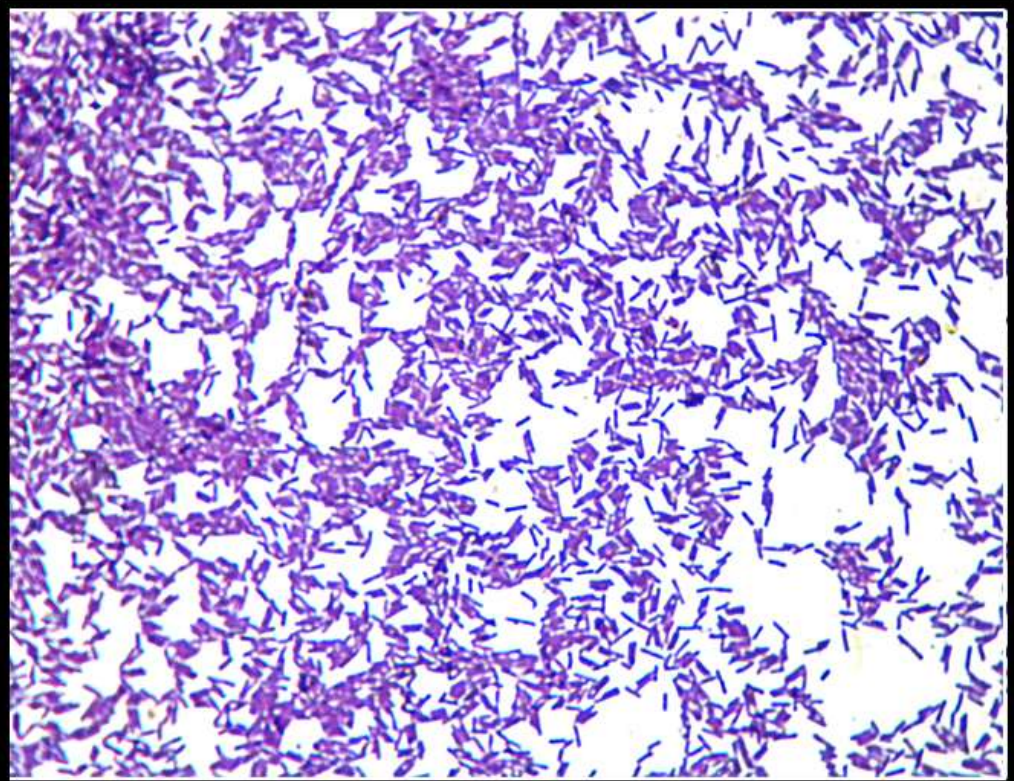
MANTO18-CB-M9YAc-03



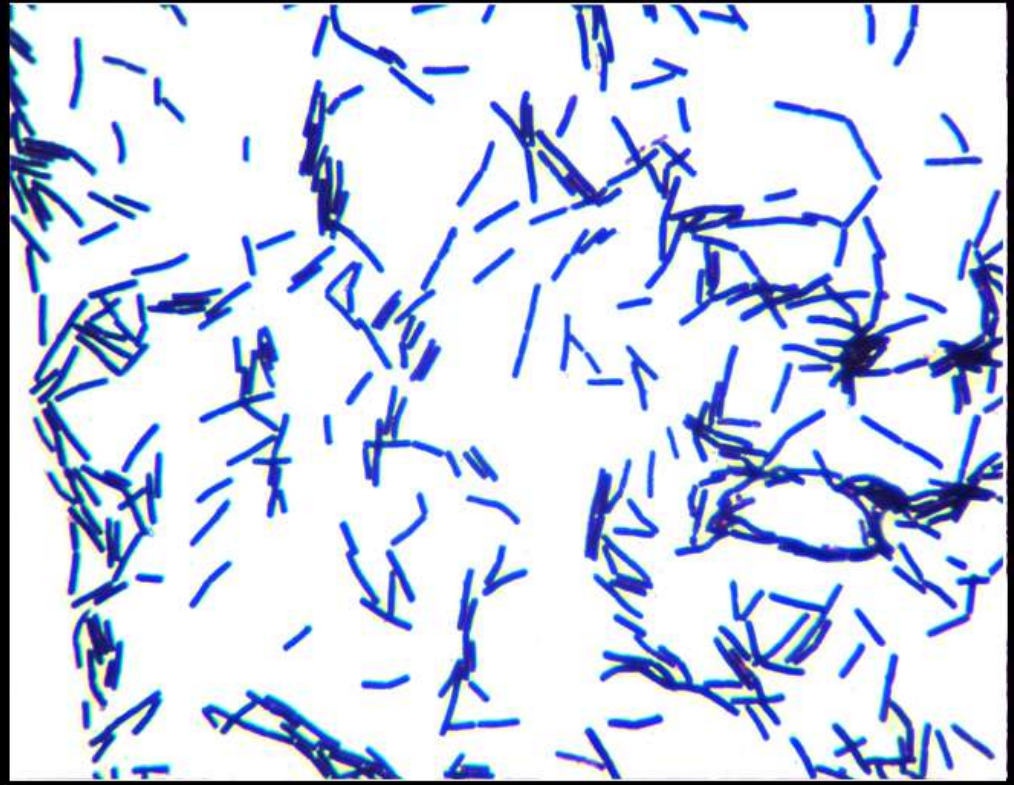
MANTO7ET-CB-M9YAc-04



MANTO7ET-CB-M9YAc-05



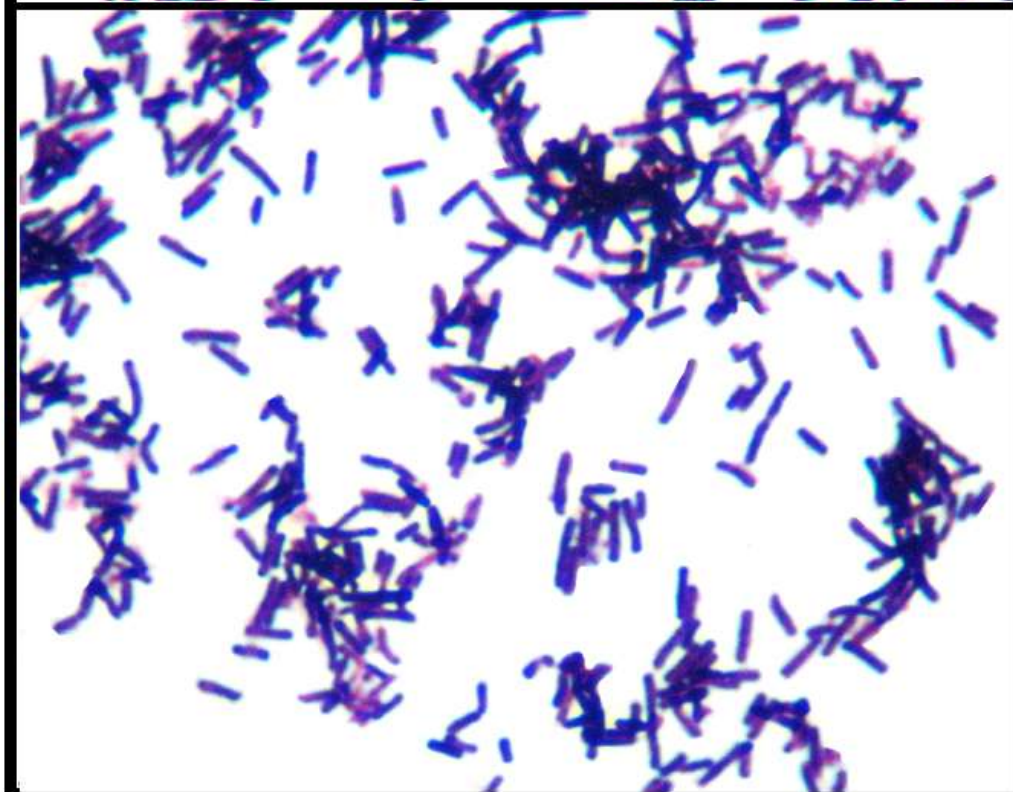
MANTO11-CB-RCM-06



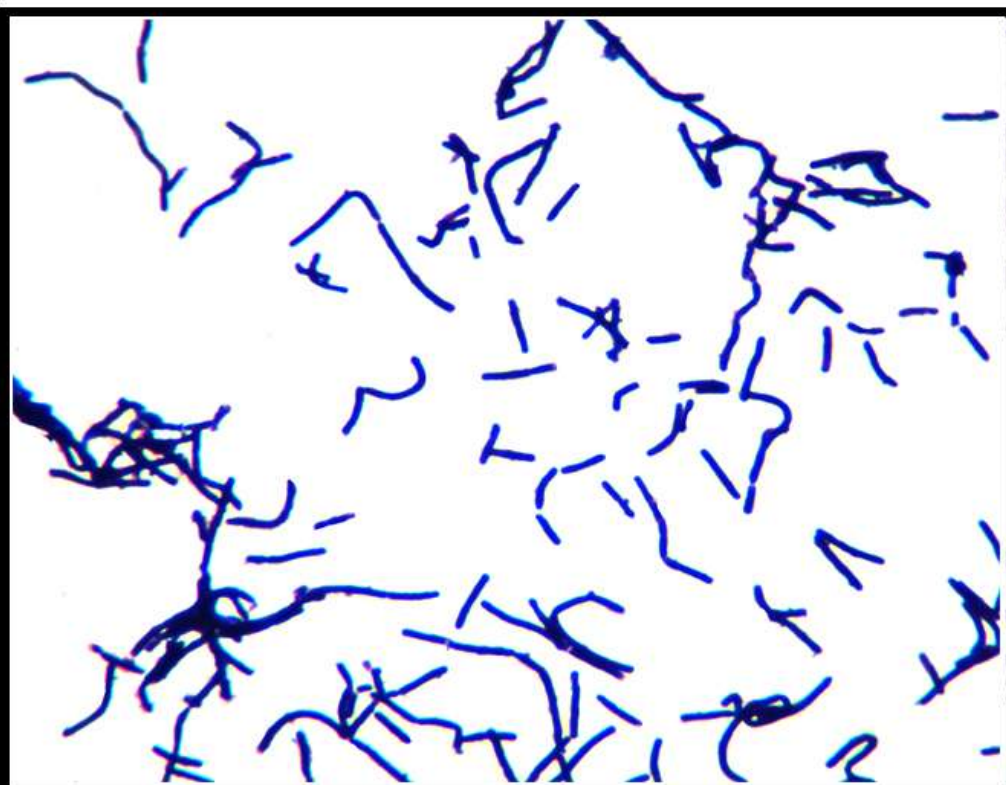
MANTO11-CB-RCM-07



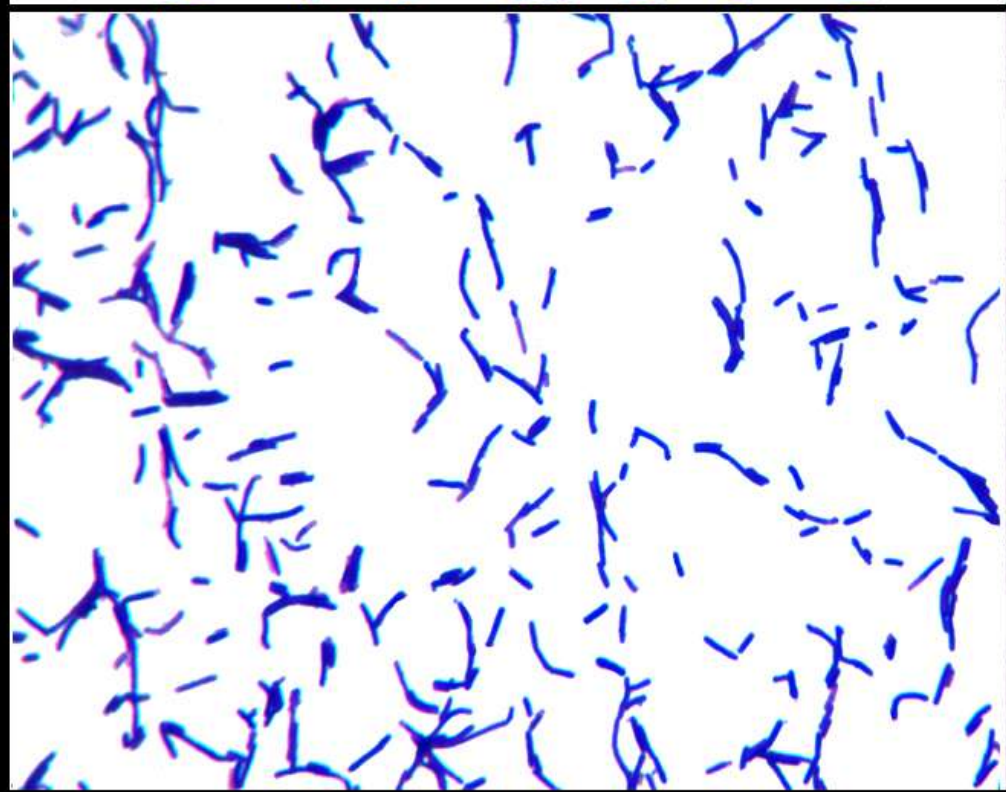
MANTO11-CB-RCM-08



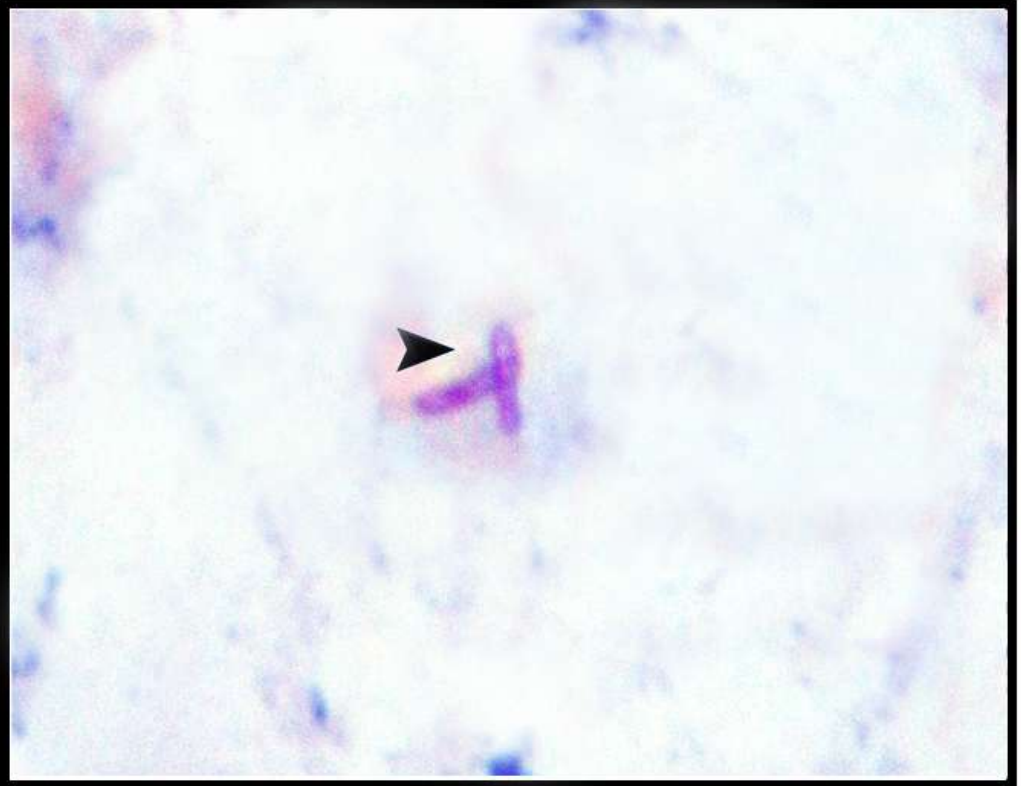
MANTO11-CB-RCM-09



MANTO11-CB-RCM-10



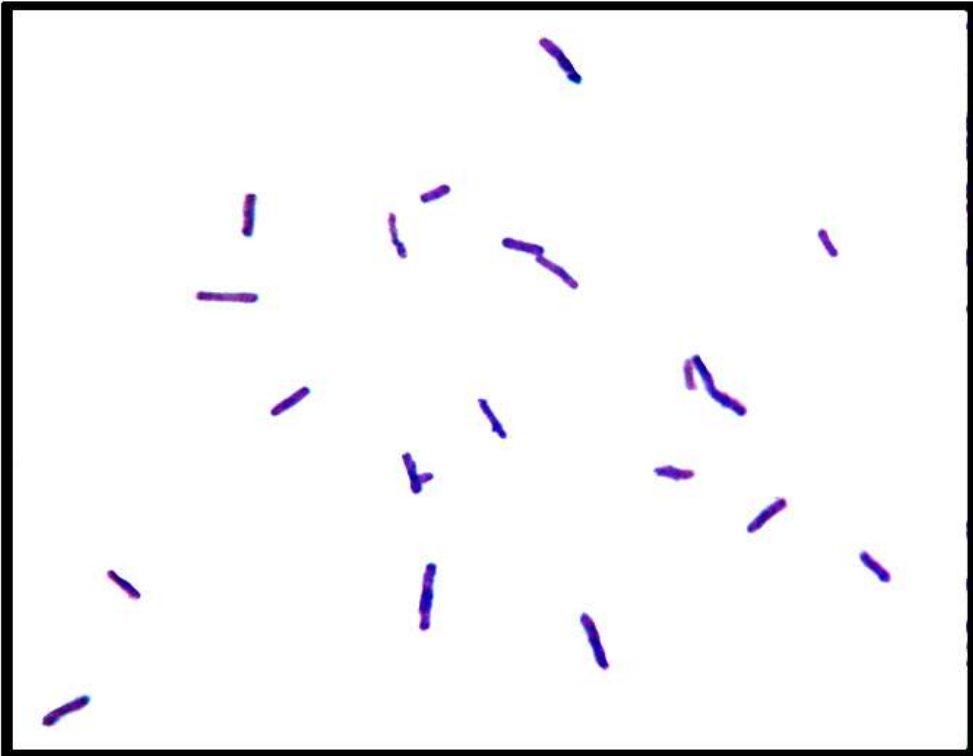
MANTO18-CB-RCM-11



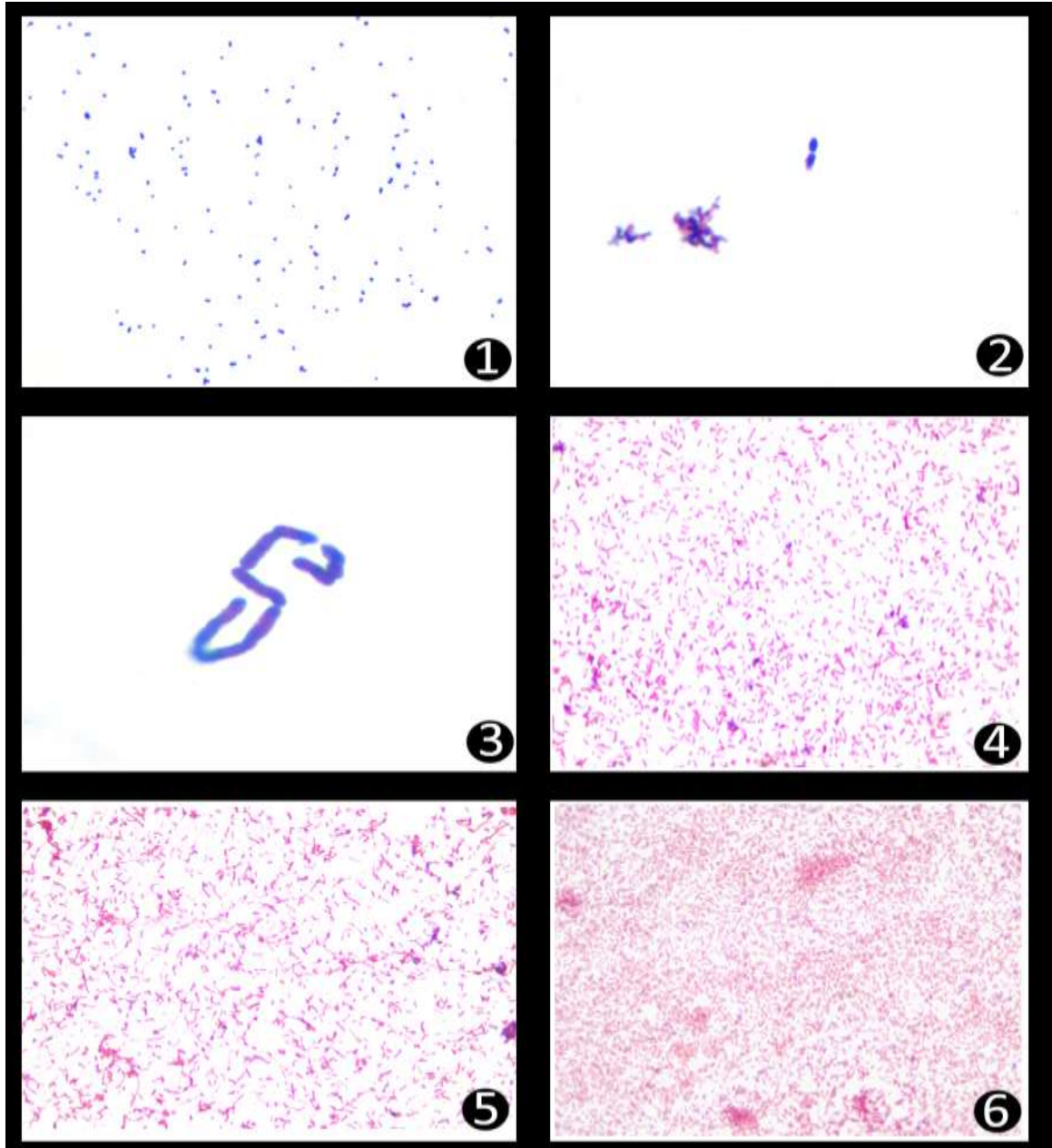
MANTO11-CB-RCM-12



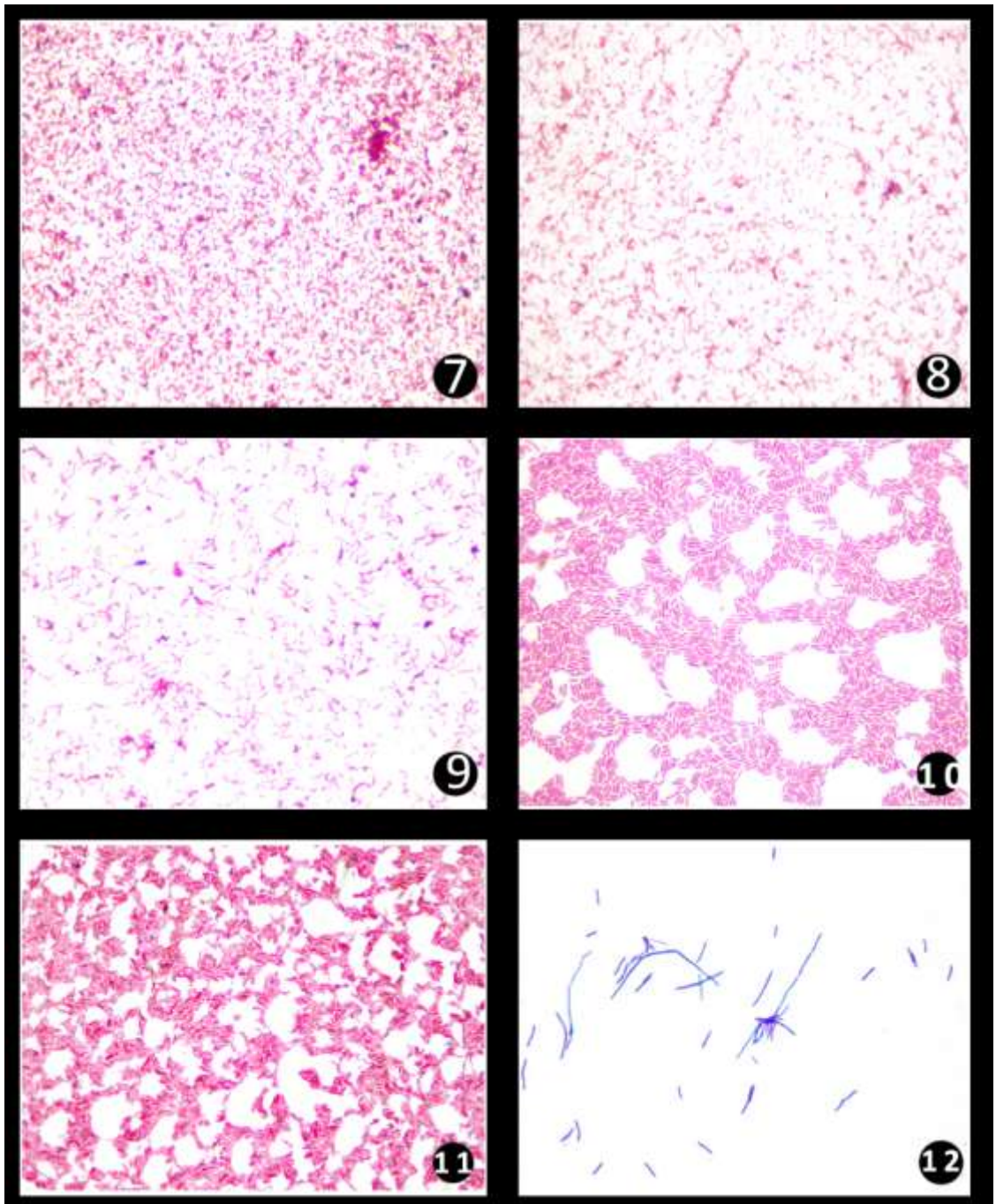
MANTO11-CB-RCM-13



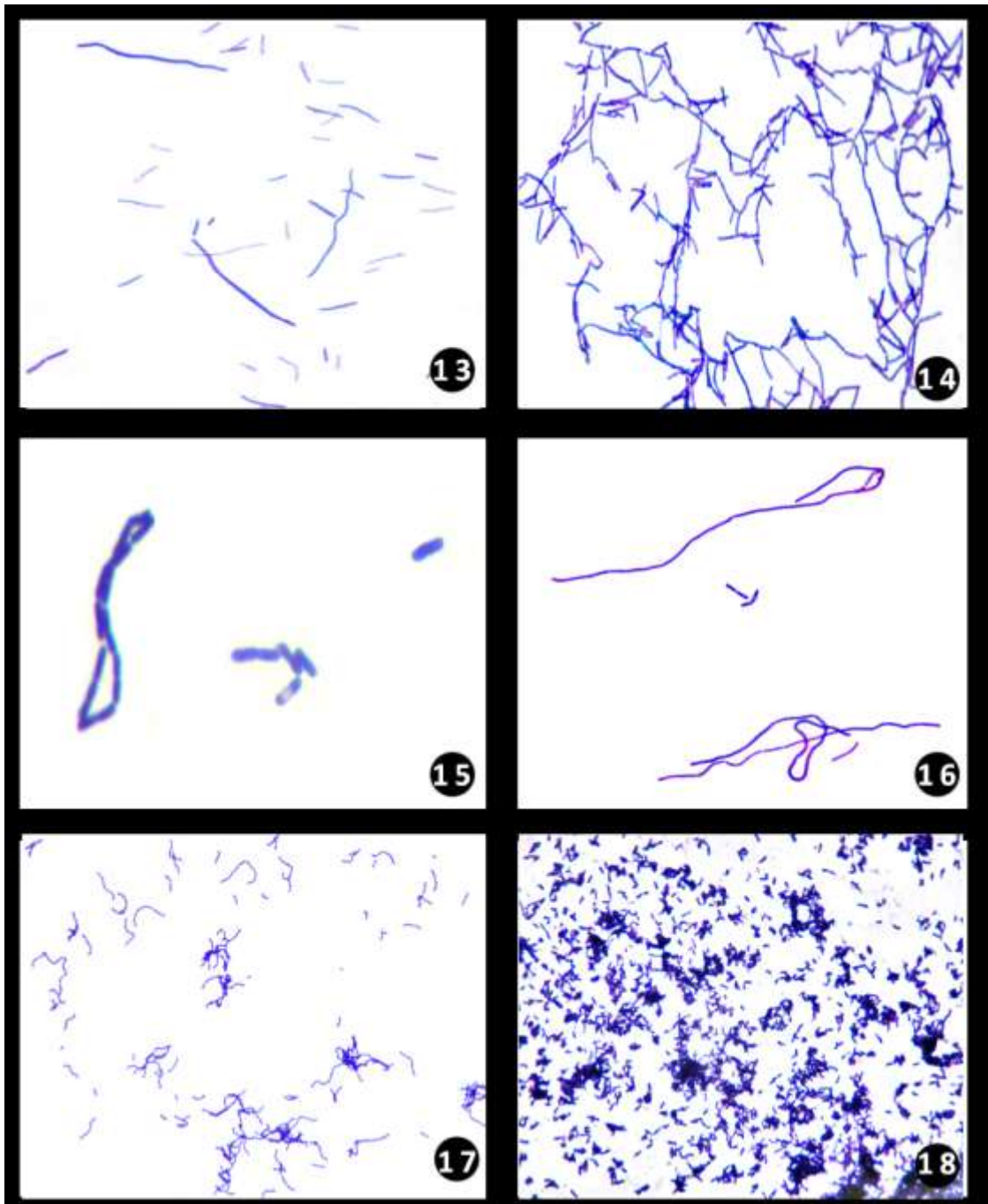
Anexo 2. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de las cepas de referencia.



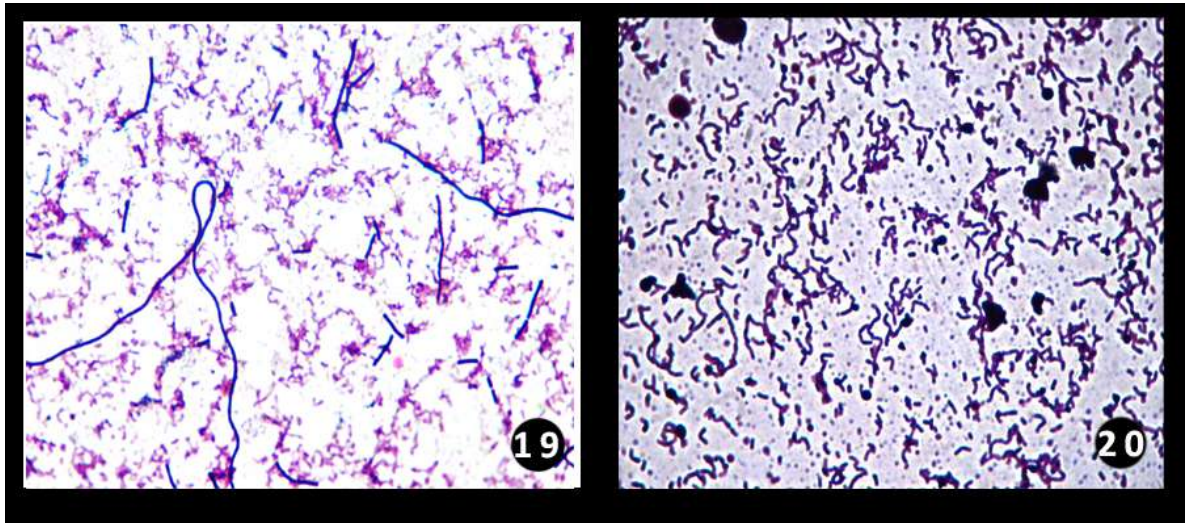
1. *Staphylococcus aureus* ATCC[®]33592[™]; 2. *Bacillus cereus* ATCC[®]10876[™]; 3. *Bacillus megaterium* ATCC[®]9885[™]; 4. *Enterobacter aerogenes* ATCC[®]35029[™]; 5. *Escherichia coli* JM101 ATCC[®]33876[™]; 6. *Citrobacter braakii* ATCC[®]43162[™].



7. *Salmonella typhimurium* ATCC[®]13311™; 8. *Proteus vulgaris* ATCC[®]33420™; 9. *Providencia alcalifaciens* ATCC[®]51902™; 10. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®]10145™; 11. *Pseudomonas fluorescens* ATCC[®]13525™; 12. *Bacillus licheniformis* ATCC[®]12759™.



13. *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa* ATCC[®] 43865[™]; 14. *Bacillus sphaericus* ATCC[®] 4525[™]; 15. *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* ATCC[®]10149[™]; 16. *Bacillus subtilis* ATCC[®] 6633[™]; 17. *Streptococcus mutans* ATCC[®] 25175[™]. 18. *Actinomyces viscosus* ATCC[®] 15987[™].



19. *Clostridium bifermentans* ATCC[®]15987™; 20. *Streptomyces griseus* ss. *griseus* ATCC[®]10137™.

Anexo 3. Características morfológicas, fisiológicas y del metabolismo de la colección de aislados.

CÓDIGO AISLADO	CD	MI	Morfología celular				Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas										
			GS	SFS	BF	Mo	OxR	Cat	Oxi	MC1	MC2	EMB	Cit	ONPG	Lac G	Lac Ac	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33592™	08/08/2011	CN	+	-	C	-	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 10876™	08/08/2011	CN	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC®9885™	08/08/2011	CN	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 35029™	08/08/2011	CN	-	-	B	+	FAn	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> JM101 ATCC® 33876™	08/08/2011	CN	-	-	B	+	FAn	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC®43162™	08/08/2011	CN	-	-	B	+	FAn	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311™	08/08/2011	CN	-	-	B	+	FAn	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420™	08/08/2011	CN	-	-	B	+	FAn	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC®51902™	09/08/2011	CN	-	-	B	+	FAn	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®10145™	05/10/2011	P	-	-	B	+	Ae	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC®13525™	02/02/2012	P	-	-	B	+	Ae	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC®12759™	15/09/2011	CN	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC®43865™	08/08/2011	TRI	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC®4525™	15/09/2011	CN	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC®10149™	22/07/2011	CN	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC®6633™	22/07/2011	CN	+	+	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175™	01/09/2011	RCM	+	-	C	-	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC®15987™	03/12/2011	RCM	+	-	F	-	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces griseus</i> ss. <i>griseus</i> ATCC®10137™	17/03/2012	CN	+	+	F	-	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium bif fermentans</i> ATCC®10137™	03/12/2011	RCM	+	+	B	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9Y-01	22/07/2011	M9Y	+	+	B	-	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9Y-02	15/02/2012	M9Y	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-03	22/07/2011	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YGlu-04	14/03/2012	M9YGlu	+	+	B	-	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	MI	Morfología celular				Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas									
			GS	SFS	BF	Mo	OxR	Cat	Oxi	MC1	MC2	EMB	Cit	ONPG	Lac G	Lac Ac
MANTO19-WB-M9YAc-05	22/07/2011	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-06	01/09/2011	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-07	22/08/2011	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-08	22/07/2011	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-09	22/07/2011	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-10	14/03/2012	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-11	22/08/2011	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	+	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-12	01/11/2011	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-13	15/02/2012	M9YGly	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YEt-14	22/07/2011	M9YEt	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-15	04/02/2012	RCM	+	-	F	+	An	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-16	15/02/2012	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-17	11/11/2011	M9YGly	-	-	B	+	FAn	-	+	+	-	+	+	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-18	26/08/2011	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-19	15/09/2011	M9YGly	-	-	B	+	FAn	-	+	+	-	+	+	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-20	25/02/2012	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-21	25/02/2012	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	+	-	-	+	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YEt-22	22/08/2011	M9YEt	-	-	B	+	Ae	-	+	-	-	+	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-23	20/02/2012	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-24	27/10/2011	M9YGly	-	-	B	+	Ae	-	+	+	-	+	+	-	-	-
MANTO11-WB-M9Y-25	20/02/2012	M9Y	+	+	B	+	FAn	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9Y-26	15/09/2011	M9Y	-	-	B	+	FAn	-	+	+	-	+	-	-	-	-
MANTO12-WB-M9YGly-27	15/02/2012	M9YGly	+	-	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-28	27/10/2011	M9YGly	-	-	B	+	FAn	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MANTO5-WB-M9Y-29	27/10/2011	M9Y	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-30	27/10/2011	RCM	+	-	F	+	An	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	MI	Morfología celular				Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas										
			GS	SFS	BF	Mo	OxR	Cat	Oxi	MC1	MC2	EMB	Cit	ONPG	Lac G	Lac Ac	
MANTO18-WB-RCM-31	27/10/2011	RCM	+	-	F	+	An	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO18-WB-RCM-32	11/11/2011	RCM	+	-	B	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-33	03/12/2011	RCM	+	-	F	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO18-WB-RCM-34	04/02/2012	RCM	+	-	F	+	An	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO1-CB-M9YAc-01	03/12/2011	M9YAc	+	-	F	+	FAn	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MANTO7ET-CB-M9YAc-02	28/01/2012	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MANTO18-CB-M9YAc-03	25/02/2012	M9YAc	+	+	B	-	FAn	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
MANTO7ET-CB-M9YAc-04	03/12/2011	M9YAc	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO7ET-CB-M9YAc-05	03/12/2011	M9YAc	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-06	29/03/2012	RCM	+	+	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-CB-RCM-07	29/03/2012	RCM	+	-	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-08	03/12/2011	RCM	+	-	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-09	29/03/2012	RCM	+	-	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-10	29/03/2012	RCM	+	-	B	+	FAn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-CB-RCM-11	29/03/2012	RCM	+	-	B	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-12	29/03/2012	RCM	+	-	B	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-13	29/03/2012	RCM	+	-	B	+	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas														
		Glyc G	Glyc Ac	Mal G	Mal Ac	Suc G	Suc Ac	Glu G	Glu Ac	Ace G	Ace Ac	Eta G	Eta Ac	Man G	Man Ac	MR
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33592™	08/08/2011	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 10876™	08/08/2011	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC®9885™	08/08/2011	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 35029™	08/08/2011	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> JM101 ATCC® 33876™	08/08/2011	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC®43162™	08/08/2011	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311™	08/08/2011	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420™	08/08/2011	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	09/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®10145™	05/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC®13525™	02/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC®12759™	15/09/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC®43865™	08/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC®4525™	15/09/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC®10149™	22/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC®6633™	22/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175™	01/09/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC®15987™	03/12/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces griseus</i> ss. <i>griseus</i> ATCC®10137™	17/03/2012	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Clostridium bifermentans</i> ATCC®10137™	03/12/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9Y-01	22/07/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9Y-02	15/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-03	22/07/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YGlu-04	14/03/2012	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas														
		Glyc G	Glyc Ac	Mal G	Mal Ac	Suc G	Suc Ac	Glu G	Glu Ac	Ace G	Ace Ac	Eta G	Eta Ac	Man G	Man Ac	MR
MANTO19-WB-M9YAc-05	22/07/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-06	01/09/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-07	22/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-08	22/07/2011	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
MANTO19-WB-M9YAc-09	22/07/2011	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-10	14/03/2012	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-11	22/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-12	01/11/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-13	15/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-WB-M9YEt-14	22/07/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-15	04/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO19-WB-M9YAc-16	15/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-WB-M9YGly-17	11/11/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-18	26/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-WB-M9YGly-19	15/09/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-20	25/02/2012	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
MANTO19-WB-M9YAc-21	25/02/2012	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
MANTO11-WB-M9YEt-22	22/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-23	20/02/2012	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
MANTO11-WB-M9YGly-24	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9Y-25	20/02/2012	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
MANTO19-WB-M9Y-26	15/09/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO12-WB-M9YGly-27	15/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-28	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO5-WB-M9Y-29	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-30	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas															
		Glyc G	Glyc Ac	Mal G	Mal Ac	Suc G	Suc Ac	Glu G	Glu Ac	Ace G	Ace Ac	Eta G	Eta Ac	Man G	Man Ac	MR	
MANTO18-WB-RCM-31	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO18-WB-RCM-32	11/11/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-33	03/12/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO18-WB-RCM-34	04/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO1-CB-M9YAc-01	03/12/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO7ET-CB-M9YAc-02	28/01/2012	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO18-CB-M9YAc-03	25/02/2012	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
MANTO7ET-CB-M9YAc-04	03/12/2011	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO7ET-CB-M9YAc-05	03/12/2011	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-CB-RCM-06	29/03/2012	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
MANTO11-CB-RCM-07	29/03/2012	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-08	03/12/2011	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-CB-RCM-09	29/03/2012	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
MANTO11-CB-RCM-10	29/03/2012	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
MANTO18-CB-RCM-11	29/03/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-12	29/03/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO11-CB-RCM-13	29/03/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas											
		VP	Ure	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	Ind	Gel	MS1	MS2	DNA	Starch	C 50°C	C 60°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33592™	08/08/2011	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 10876™	08/08/2011	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC® 9885™	08/08/2011	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 35029™	08/08/2011	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> JM101 ATCC® 33876™	08/08/2011	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC® 43162™	08/08/2011	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311™	08/08/2011	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420™	08/08/2011	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	09/08/2011	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145™	05/10/2011	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC® 13525™	02/02/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC® 12759™	15/09/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ATCC® 43865™	08/08/2011	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC® 4525™	15/09/2011	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC® 10149™	22/07/2011	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633™	22/07/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™	01/09/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC® 15987™	03/12/2011	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Streptomyces griseus</i> ss. <i>griseus</i> ATCC® 10137™	17/03/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Clostridium bifermentans</i> ATCC® 10137™	03/12/2011	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MANTO19-WB-M9Y-01	22/07/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MANTO19-WB-M9Y-02	15/02/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
MANTO19-WB-M9YAc-03	22/07/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MANTO19-WB-M9YGlu-04	14/03/2012	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas											
		VP	Ure	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	Ind	Gel	MS1	MS2	DNA	Starch	C 50°C	C 60°C
MANTO19-WB-M9YAc-05	22/07/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-06	01/09/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-07	22/08/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
MANTO19-WB-M9YAc-08	22/07/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
MANTO19-WB-M9YAc-09	22/07/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-10	14/03/2012	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-11	22/08/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
MANTO19-WB-M9YAc-12	01/11/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MANTO11-WB-M9YGly-13	15/02/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MANTO11-WB-M9YEt-14	22/07/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MANTO18-WB-RCM-15	04/02/2012	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MANTO19-WB-M9YAc-16	15/02/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
MANTO11-WB-M9YGly-17	11/11/2011	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-18	26/08/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MANTO11-WB-M9YGly-19	15/09/2011	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
MANTO19-WB-M9YAc-20	25/02/2012	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MANTO19-WB-M9YAc-21	25/02/2012	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MANTO11-WB-M9YEt-22	22/08/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO19-WB-M9YAc-23	20/02/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
MANTO11-WB-M9YGly-24	27/10/2011	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
MANTO11-WB-M9Y-25	20/02/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
MANTO19-WB-M9Y-26	15/09/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO12-WB-M9YGly-27	15/02/2012	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MANTO11-WB-M9YGly-28	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
MANTO5-WB-M9Y-29	27/10/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
MANTO18-WB-RCM-30	27/10/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Anexo 3. Continuación.

CÓDIGO AISLADO	CD	Pruebas de Metabolismo y Bioquímicas											
		VP	Ure	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	Ind	Gel	MS1	MS2	DNA	Starch	C 50°C	C 60°C
MANTO18-WB-RCM-31	27/10/2011	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
MANTO18-WB-RCM-32	11/11/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MANTO18-WB-RCM-33	03/12/2011	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MANTO18-WB-RCM-34	04/02/2012	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MANTO1-CB-M9YAc-01	03/12/2011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANTO7ET-CB-M9YAc-02	28/01/2012	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
MANTO18-CB-M9YAc-03	25/02/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MANTO7ET-CB-M9YAc-04	03/12/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MANTO7ET-CB-M9YAc-05	03/12/2011	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MANTO11-CB-RCM-06	29/03/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MANTO11-CB-RCM-07	29/03/2012	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
MANTO11-CB-RCM-08	03/12/2011	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
MANTO11-CB-RCM-09	29/03/2012	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
MANTO11-CB-RCM-10	29/03/2012	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
MANTO18-CB-RCM-11	29/03/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MANTO11-CB-RCM-12	29/03/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MANTO11-CB-RCM-13	29/03/2012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

El código del aislado está relacionado con el origen del aislado (manto muestreado): **(WB:** agua de biorreactor (canister); **CB:** carbón de biorreactor (canister)); **CD:** fecha de conservación; **MI:** medio usado para el aislamiento de bacterias (**CN:** Caldo Nutritivo; **P:** P agar; **RCM:** Reinforced Clostridium medium; **M9Y:** medio mínimo de sales M9 suplementado con extracto de levadura; **M9YAc:** medio mínimo de sales M9 suplementado con extracto de levadura y acetato de sodio; **M9YGlu:** medio mínimo de sales M9 suplementado con extracto de levadura y glucosa; **M9YGly:** medio mínimo de sales M9 suplementado con extracto de levadura y glicerol; **M9YEt:** medio mínimo de sales M9 suplementado con extracto de levadura y etanol); **GS:** método tinción de Gram; **SFS:** método tinción de esporas Schaeffer-Fulton; **BF:**

formas bacterianas (**B**: bacilo; **C**: coco; **F**: filamento); **Mo**: motilidad; **OxR**: relación oxígeno bacteriano (**Ae**: aerobio; **FAn**: anaerobio facultativo; **An**: anaerobio); **Cat**: presencia enzima catalasa; **Oxi**: presencia enzima oxidasa; **MC1**: tolerancia a sales biliares medido como crecimiento en medio MacConkey agar MERCK; **MC2**: fermentación de lactosa medido por el medio diferencial MacConkey agar MERCK; **EMB**: fermentación de lactosa medido por el medio diferencial Levine Eosina Azul de Metileno agar MERCK; **Cit**: uso de citrato como fuente de carbono en medio Citrato Simmons agar MERCK; **ONPG**: presencia de enzima β -galactosidasa medido por prueba ONPG en medio Lactosa caldo OXOID; **Lac G**: fermentación de lactosa medido por producción de gas en medio Lactosa caldo OXOID; **Lac Ac**: fermentación de lactosa medido por acidificación en medio Lactosa caldo OXOID; **Glyc G**: fermentación de glicerol medido por producción de gas en medio Glicerol rojo de fenol caldo; **Glyc Ac**: fermentación de glicerol medido por producción de ácido Glicerol rojo de fenol caldo; **Mal G**: fermentación de maltosa medido por producción de gas en medio Maltosa rojo de fenol caldo; **Mal Ac**: fermentación de maltosa medido por acidificación en medio Maltosa rojo de fenol caldo; **Suc G**: fermentación de sacarosa medido por producción de gas en medio Sacarosa rojo de fenol caldo; **Suc Ac**: fermentación de sacarosa medido por acidificación en medio Sacarosa rojo de fenol caldo; **Glu G**: fermentación de glucosa medido por producción de gas en medio Glucosa rojo de fenol caldo; **Glu Ac**: fermentación de glucosa medido por acidificación en medio Glucosa rojo de fenol caldo; **Ace G**: fermentación de acetato de sodio medido por producción de gas en medio Acetato de sodio rojo de fenol caldo; **Ace Ac**: fermentación de acetato de sodio medido por acidificación en medio Acetato de sodio rojo de fenol caldo; **Eta G**: fermentación de etanol medido por producción de gas en medio Etanol rojo de fenol caldo; **Eta Ac**: fermentación de etanol medido por acidificación en medio Etanol rojo de fenol caldo; **Man G**: fermentación de manitol medido por producción de gas en medio Manitol rojo de fenol caldo; **Man Ac**: fermentación de manitol medido por acidificación en medio Manitol rojo de fenol caldo; **MR**: fermentación ácido-mixta medido en medio Rojo de metilo-Voges Proskauer (MR-VP) OXOID; **VP**: producción de 2,3-butanediol a partir de glucosa medido en medio MR-VP; **Ure**: presencia de enzima ureasa como fuente de carbono medido en medio BBL™ Urea agar base; **H₂S (LEA)**: producción de sulfuro de hidrógeno en medio LEA; **H₂S (SIM)**: producción de sulfuro de hidrógeno en medio SIM MERCK; **Ind**: producción de indol en medio SIM MERCK; **Gel**: licuefacción de gelatina en medio Gelatina agar MERCK; **MS1**: tolerancia de sal medido como crecimiento en medio Manitol Salado agar OXOID; **MS2**: fermentación manitol medido en medio Manitol Salado agar OXOID; **DNA**: presencia de enzima hidrolítica DNA medido por el medio DNAsa agar; **Starch**: presencia de almidón medido en medio Almidón agar; **Temp 50 y 60°C**: temperaturas de crecimiento 50 y 60°C medido en el medio de crecimiento de cada aislado bacteriano; **(+)**: resultados positivos; **(-)**: resultados negativos.

Anexo 4. Propiedades del carbón y potencial de producción de gas metano de los mantos estudiados del sinclinal.

Mantos por segmento	Mantos	EA	PE	Ro	VG	%M	Análisis Isotópico				Origen del gas
							$\delta D1$	$\delta D1$	$\delta_{13}C$	$\delta_{13}C$	
Segmento ocho (mantos superiores)	Manto 19	373	500	0.74	122	99.2	- 267	- 232	- 59	- 58	Mezcla
	Manto 18	350	250	0.70	14	99.7	- 265	- 238	- 66	- 59	Biogénico
	Manto 17	337	88	0.69	2	97.1	- 123	- 197	- 35	- 40	Termogénico
Segmento cinco (mantos medios)	Manto 12	163	460	0.75	204	99.9	- 247	- 242	- 61	- 58	Mezcla
	Manto 11	154	507	0.76	636	99.9	- 262	- 229	- 49	- 49	Termogénico
	Manto 7- LE	117	230	0.83	2	97.1	- 107	- 229	- 34	- 33	Termogénico
	Manto 7- ET	117	200	0.81	33	99.8	- 223	- 235	- 64	- 63	Biogénico
	Manto 5	98	450	0.88	35	98.3	- 83	- 229	- 44	- 51	Termogénico
Segmento uno (mantos inferiores)	Manto 3	44	500	0.94	ND	99.9	- 268	- 219	- 55	- 40	Mezcla
	Manto 1	22	400	0.97	4	99.6	- 244	- 229	- 78	- 55	Biogénico

(Datos tomados de Araque-Nuñez y García-González, 2011). **EA:** Espesor acumulado en metros. **PE:** Profundidad de extracción en metros. **Ro:** Reflectancia de vitrinita. **VG:** volúmenes de gas en $cm^3/1000g$ de carbón. **%M:** Porcentaje de metano en el gas. **ND:** dato no disponible.

Anexo 5. Geoquímica del agua asociada con los mantos de carbón del sinclinal.

Mantos por segmento	Mantos	pH	TSD	CaCO ₃	HCO ₃	Ca	SAL	Na	Cl	COND	ALCALI	Mg	K	NO ₃	SO ₄
Segmento ocho (mantos superiores)	Manto 19	7.2	1358	0.8	5.2	0.8	0.9	14.6	0.4	2090	4.9	0.4	0.21	0.38	22.7
	Manto 18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Manto 17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Segmento cinco (mantos medios)	Manto 12	7.2	1204	15.6	6.4	15.6	0.8	6.4	0.5	1852	6.7	9.5	0.45	0.31	47.9
	Manto 11	7.1	2372	4.7	5.2	4.7	1.8	22.7	2.0	3650	5.0	3.0	0.02	0.28	31.2
	Manto 7- LE	3.8	1898	16.5	0.4	16.4	1.4	6.4	2.4	2920	ND	10.1	0.70	0.38	46.9
	Manto 7- ET	7.2	1090	4.2	3.6	4.2	0.7	7.8	0.4	1677	3.9	2.6	0.10	0.38	33.9
	Manto 5	8.2	738	1.1	4.4	1.1	0.3	10.2	0.4	1135	4.9	0.6	0.25	0.28	6.5
Segmento uno (mantos inferiores)	Manto 3	7.9	875	1.8	4.8	1.8	0.5	8.4	0.3	1346	6.8	1.2	0.17	0.38	7.3
	Manto 1	7.9	1313	0.4	6.8	6.2	0.9	12.5	0.7	2020	7.5	0.3	0.23	0.38	11.4

(Datos tomados de Araque-Nuñez y García-González, 2011). **TSD:** Total de sólidos disueltos (mg/L) es una medida de la dureza del agua. **CaCO₃:** Carbonato de calcio en miliequivalentes por litro (meq/L) es una medida de la dureza del agua. **HCO₃:** El ion bicarbonato en miliequivalentes por litro (meq/L) es una medida de la dureza del agua. **Ca:** Ion calcio en miliequivalentes por litro (meq/L). **SAL:** Salinidad en partes por millón (ppm). **Na:** El ion Sodio en miliequivalentes por litro (meq/L) **Cl:** El ion cloruro en miliequivalentes por litro (meq/L) **COND:** Conductividad (µS/cm). **ALCALI:** Alcalinidad (mmol/L). **Mg:** Magnesio en miliequivalentes por litro (meq/L). **K:** Potasio en miliequivalentes por litro (meq/L). **NO₃:** Nitratos disueltos en miliequivalentes por litro (meq/L). **SO₄:** Sulfatos en miliequivalentes por litro (meq/L). **ND:** dato no disponible.