

**CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE
MANTOS DE CARBÓN EN LA MINA CERREJÓN (GUAJIRA, COLOMBIA).**

SILVIA XIMENA BARRIOS MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2014**

**CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE
MANTOS DE CARBÓN EN LA MINA CERREJÓN (GUAJIRA, COLOMBIA).**

SILVIA XIMENA BARRIOS MARTÍNEZ

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

2014

**A MI FAMILIA
POR QUE SU AMOR Y EJEMPLO
SON LOS PILARES DE MI VIDA.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Luis Fuentes por su calidad profesional, dedicación en el desarrollo de este proyecto y por depositar en mí la confianza para la realización del mismo.

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

Al Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (Escuela de Biología, UIS), por la financiación de este proyecto.

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

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental (Escuela de Biología, UIS), en especial a Nathalia Quintero y Liliana Santamaria.

A mis padres Luis Barrios y Ines Martínez; mi hermana Karol Barrios y mi hermosa sobrina Gabriela Guzmán porque con su amor y confianza incondicional, me apoyaron para lograr mis propósitos.

A, Jonathan Lozano, por ser el mejor compañero. Gracias por su amor y paciencia, sin los cuales no habría logrado esta meta.

A todos mis amigos Ana, Cinthy, Joha, Cindy, Kata y Cesar gracias por su compañía en los buenos y malos momentos que tuvieron estos años. Pues es por ustedes que siempre tendré los mejores recuerdos de la universidad.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEORICO	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 MUESTREO	25
2.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS DE REFERENCIA	27
2.3 AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE LAS MUESTRAS	29
2.4 AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GAS A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE CARBÓN	30
2.5 CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES MICROBIANAS	31
2.6 ENSAYOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y DEL METABOLISMO DE LA COLECCIÓN DE AISLADOS	32
2.7 ANÁLISIS DE GRUPOS METABÓLICOS DE LA COLECCIÓN DE AISLADOS	33
2.8 ENSAYO DE PRODUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE GAS BIOGÉNICO	33
3. RESULTADOS	35
3.1 DESCRIPCIÓN DE COLECCIÓN DE AISLADOS.....	35
3.2 GRUPOS METABÓLICOS DE LA COLECCIÓN DE AISLADOS	36
3.3 MANTO DE CARBÓN PRODUCTOR DE GAS BIOGÉNICOS	41
4. DISCUSIÓN	46
5. CONCLUSIONES	52
6. RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFIA	54
ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema sobre la conversión de sustratos orgánicos complejos del carbón en gas metano. Modificado de Wang et al., 2010.	20
Figura 2 Mapa zona de muestreo, Cerrejón, Guajira Colombia	25
Figura 3 Esquema representativo de la ubicación de las muestras de agua, lodo y carbón.....	26
Figura 4 Bio-reactores usados para producción de gas a partir de muestras de carbón.....	31
Figura 5 Grupos metabólicos de la colección de aislados basados en distancias fenotípicas.....	38
Figura 6 Acumulación de gas biogénico en medio líquido y semisólido.	42
Figura 7. Producción de gas biogénico a partir de muestras del manto de carbón en estudio. Los bioreactores fueron preparados con las muestras de carbón esterilizadas superficialmente, trituradas y cultivadas en medio RCM.....	43
Figura 8 Valores promedio de concentraciones de gas CO ₂ y CH ₄ producidas en bio-reactores con diferentes aislados microbianos y combinaciones de estos, con sus respectivas desviaciones estándar. Tratamientos: 1: UC-13, 2: UC-14, 3: UC-15, 4: UC.16, 5: Combinación UC-13/14, 6: Combinación UC-13/15, 7: Combinación UC-13/16, 8: Combinación UC-14/15, 9: Combinación UC-14/16, 10: Combinación UC-15/16. NMC: Nivel mínimo de cuantificación. Se incluyen los niveles mínimos de detección del equipo GC-FID.	44

Figura 9 Clases bacterianas mejor representadas en las comunidades microbianas de los mantos de carbón reportados en la literatura (Green et al., 2008; Li et al., 2008; Fry et al., 2009; Jones et al., 2010; Beckmann et al., 2011; Guo et al., 2012; Tang et al., 2012; Gallagher et al., 2013; Meslé et al., 2013).47

Figura 10 Modelo de degradación del carbón bituminoso para la producción de gas biogénico.....49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Estudios de poblaciones microbianas asociadas a mantos de carbón, y su porcentaje de insidencia en la literarura (Green et al., 2008, Li et al., 2008, Fry et al., 2009, Jones et al., 2010, Beckmann et al., 2011, Tang et al., 2012, Guo et al., 2012, Meslé et al., 2013, Gallagher et al., 2013, Singh y Tripathi, 2013).....	18
Tabla 2 Géneros microbianos asociados a la biodegradación de algunos hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP). (Samanta et al., 2002, Hedlund et al., 1999, Kiyohara y Nagao, 1978, Bastiaens et al., 2000, Kanaly y Harayama, 2000, Juhasz et al., 2000).....	23
Tabla 3 Coordenadas de los puntos de muestreo.	26
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo usados.....	28
Tabla 5 Número de aislados microbianos obtenidos a partir de muestras de diferentes orígenes en el complejo minero Cerrejón y medios de cultivos.	35
Tabla 6 Valores propios. Contribución de las variables a cada componente y variables de media contribución a la variabilidad total del análisis de componentes principales.....	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de la zona de muestreo.....	65
Anexo 2 Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de las cepas de referencia.....	107
Anexo 3. Características morfológicas, fisiológicas y del metabolismo de la colección de aislados.....	111
Anexo 4 Análisis estadístico, tabla de correlación por pares de variables.....	124
Anexo 5 Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID). A: Blanco deL procedimiento, B: Patrón de gases, C: UC-13, D: UC-15, E: UC-14/15 F: UC-14/16.	125

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE MANTOS DE CARBÓN EN LA MINA CERREJÓN (GUAJIRA, COLOMBIA).*

AUTOR: Silvia Ximena Barrios *

PALABRAS CLAVES: Bacteria, biodegradación, mantos de carbón, metano, gas biogénico

DESCRIPCIÓN:

En la presente investigación se estudiaron muestras de un manto de carbón, así como; de lodo y agua de una laguna oxidación de la Mina el cerrejón (La Guajira, Colombia), con el fin de caracterizar microbiológicamente los consorcios microbianos cultivables involucrados en la producción de gas biogénico. La abundancia microbiana disminuyó de la superficie al subsuelo profundo (manto de carbón) y en correspondencia, se presentó un número mayor de grupos metabólicos en la a laguna de oxidación y superficie respecto al manto de carbón estudiado. Un análisis de conglomerados basado en descriptores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, agrupó los aislados microbianos obtenidos en tres grupos metabólicamente diferentes (A, B y C); algunos con subgrupos. Los grupos mostraron proximidad metabólica con cepas de referencia representativas de las familias Actinomycetaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Pseudomonadaceae y Streptomycetaceae. El medio de enriquecimiento RCM resultó ser adecuado para el crecimiento de bacterias productoras de gases biogénicos provenientes de muestras de carbón. Basados en ensayos microbianos *in vitro* combinado acoplado con cromatografía de gases se encontró que el mayor componente del gas biogénico producido por los microorganismos del manto fue CO₂; mostrando la alta capacidad fermentativa de estos aislados microbianos. Los datos son discutidos considerando el potencial de la colección de aislados con fines de biodegradación de residuos de carbón mineral y de producción *in situ* de gas metano.

* 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.).

ABSTRACT

TITLE: METABOLIC CHARACTERIZATION OF MICROBIAL ISOLATED FROM COAL BEDS IN CERREJÓN MINE (GUAJIRA, COLOMBIA)

AUTHOR: Silvia Ximena Barrios *

KEY WORDS: bacterium, biodegradation, coal beds, methane gas biogenic

DESCRIPTION:

In the present study samples from coalbeds, as well as, mud and water from an oxidation pond at the coal mine Cerrejón (La Guajira, Colombia), were studied for microbiological characterization of cultivable microbial consortia involved in biogenic gas production. Microbial abundance decreased from the surface to the deep subsoil (coalbed). In that connection, it was shown a higher number of metabolic groups in the oxidation pond and surface in comparison to the coalbed studied. Cluster analysis based on morphological, physiological and biochemical characters grouped microbial isolates in three metabolically different groups (A, B and C), some of those with subgroups. The groups showed metabolic proximity to Pseudomonadaceae, Actinomycetaceae, Clostridiaceae, Bacillaceae and Streptomyetaceae families. Enriched RCM (Reinforced Clostridial Medium) was suitable for the growth of bacteria that produce biogenic gases from coal samples. *Enrichment medium RCM (Reinforced Clostridial Medium) was suitable for the growth of biogenic gases producing bacteria from coal samples. Based on in vitro tests and gas chromatography, it was found that the largest component of the biogenic gas produced by the coalbed microorganisms was CO₂; showing the high fermentative capacity of these microbial isolates. The data are discussed considering the potential of microbial isolates with coal waste biodegradation purposes and in situ production of methane gas.

* 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.).

INTRODUCCIÓN

La Microbiología del carbón gana cada día mayor importancia dado que la actividad microbiana presente en formaciones geológicas con mantos de carbón, resulta en cambios en la composición del carbón mineral y de los gases asociados a estos mantos; con consecuencias económicas en la industria minera (Meslé et al., 2013). Durante la biodegradación, proceso mediante el cual los microorganismos del subsuelo profundo llevan cabo tales cambios (Cheng et al., 2007; Wang, 2010; Fallgren et al., 2013, Meslé et al., 2013), los sustratos orgánicos complejos presentes en el carbón son hidrolizados a moléculas más simples; siendo los gases metano y el dióxido de carbono los productos finales del proceso (Formolo, 2008; Orem, 2010; Strapoć, 2008; Wang, 2010; Warwick, 2008). Este proceso resulta clave en la conformación de reservorios de gas metano asociado a formaciones geológicas con mantos de carbón (Beaton et al., 2006; Longwell et al., 1995; Scott et al., 1994).

Los reservorios de gas biogénico asociado con mantos de carbón, constituyen importantes fuentes no convencionales de gas metano (Beaton et al., 2006; Longwell et al., 1995; Scott et al., 1994). Solo en Estados Unidos, la producción de gas metano asociado a mantos de carbón representa el 10% del total de consumo anual (equivalente a 1.5 TFC por año). 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). Recientemente, mediante un estudio de la composición isotópica (^{13}C y ^1D) del carbón, Martínez (2009) 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 los reservorios de gas metano

asociado a formaciones geológicas con mantos de carbón es muy alto dado que permite incrementar la generación de este recurso, y por ende, compensar la creciente demanda energética.

En este contexto, es esencial el conocimiento sobre los grupos metabólicos microbianos involucrados en la biodegradación de carbón mineral en los mantos, dado que nos permite entender estos procesos característicos del subsuelo profundo; y por ello, establecer estrategias más eficientes para la producción biogénica de gas metano a partir de carbón. Considerando además, que la minería es una industria altamente contaminante (Bamforth y Singleton, 2005; Samanta, 2002), este conocimiento puede ser de utilidad para establecer estrategias de bioremediación que mitiguen su impacto negativo sobre el ambiente (Pieper y Reineke, 2000; Ivanov, 2007).

Los estudios sobre composición microbiana de mantos de carbón, indican que las clases de bacterias: α -, β -, δ -, ϵ - γ -Proteobacterias, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes y las clases de archeobacterias: Methanomicrobia, Methanobacteria y Methanococci, son las que más frecuentemente habitan estos ambientes (Green et al., 2008; Guo et al., 2012; Klein et al., 2008; Fry et al., 2009; Li et al., 2008; Midgley et al., 2010; Penner et al., 2010; Shimizu et al., 2007; Strapoć et al., 2008; Tang et al., 2012; Wang et al., 2010). Sin embargo, se conoce poco sobre los tipos metabólicos responsables de los procesos de biodegradación que conducen a la producción de gas bio-génicos en estos mantos de carbón (Green et al., 2008; Penner et al., 2010; Shimizu et al., 2007).

En Colombia, la investigación acerca de las comunidades microbianas nativas asociadas con mantos de carbón y sobre su metabolismo, ha sido muy limitada (Mayorga, 2012). La mina de carbón Cerrejón (La Guajira, Colombia), objeto de estudio en la presente tesis, es conocida por su ambiente árido, semidesértico y

por presentar temperaturas promedio de alrededor de 40°C. Los microorganismos que habitan tales ambientes pueden presentar metabolismos extremófilos de interés para la industria minera y con fines de bio-remediación. En el presente estudio, se planteó como objetivo general: Caracterizar metabólicamente consorcios microbianos cultivables asociados con mantos de carbón de la mina Cerrejón (Guajira, Colombia) y determinar su relación con la producción de gas metano a partir del carbón. Consecuentemente se plantearon dos objetivos específicos: *i)* Caracterizar fisiológica y bioquímicamente microorganismos cultivables que habitan mantos de carbón de la mina Cerrejón (Guajira, Colombia), y *ii)* determinar la relación de estos microorganismos con la producción de gas biogénico en dichos mantos. Combinando las técnicas de: enriquecimiento microbiano, bioquímica y fisiología microbiana y la cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID, el presente estudio permitió caracterizar metabólicamente una colección de aislados, algunos extremófilos, que habitan mantos de carbón de la mina Cerrejón; los cuales pueden resultar de utilidad en futuros estudios biotecnológicos del carbón.

1. MARCO TEORICO

El carbón es uno de los recursos energéticos más abundante, en consecuencia, se ha convertido en una fuente importante de energía doméstica e industrial. Colombia cuenta con la mayor reserva de carbón de América Latina y según el Instituto Mundial del Carbón se ha posicionado como uno de los siete principales exportadores de carbón térmico. La Mina “El cerrejón”, ubicada en la Guajira, cuenta con recursos estimados en 2.193 millones de toneladas de carbón en un área de 69.000 hectáreas, siendo hoy en día una de las minas de carbón a cielo abierto más grandes del mundo (Salas, 2004). Por lo tanto, es razonable pensar que el carbón seguirá siendo una importante fuente de energía en Colombia.

El proceso de carbonificación consta de dos fases, la primera es una etapa bioquímica donde el material orgánico de plantas vasculares se convierte en turba; posteriormente, ocurre una etapa geoquímica donde la turba se transforma en lignito (Stach y Murchison, 1975). Este proceso da como resultado lo que conocemos como carbón mineral cuya estructura compleja está compuesta por materia orgánica (85-95%) como: ligninas, ácidos grasos, alcoholes, cetonas, *n*-alcanos, isoprenoides, compuestos aromáticos y alifáticos; y por materia inorgánica (5-15%) como nitrógeno, azufre, fósforo y carbono (Levine et al., 1982, Catcheside y Ralph, 1999, Fakoussa y Hofrichter, 1999, Ahmed y Smith, 2001, Formolo et al., 2008, Orem et al., 2010).

El subsuelo profundo juega un papel central en los ciclos biogeoquímicos (Tang et al., 2012), albergando entre el 75 y 94 % de los procariotas terrestres. Los mantos de carbón, contenido en este subsuelo, aportan su materia orgánica e inorgánica como sustratos de los microorganismos que participan en los mencionados ciclos

biogeológicos (Whitman et al., 1998). Es por ello, que las investigaciones dirigida a conocer la composición, diversidad y metabolismo de los consorcios microbianos presentes en mantos de carbón; así como para establecer las condiciones óptimas para su cultivo, son de particular importancia en el entendimiento de los procesos biogénicos que ocurren en los mantos de carbón.

Los géneros más representativos de la comunidad microbiana en mantos de carbón son descritos en la Tabla 1; siendo de particular importancia los siguientes: Phylum Actinobacteria, *Microbacterium* y *Cellulomonas*; Phylum Firmicutes *Actinobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium* y Phylum Proteobacteria, *Sphingomona*, *Rhodobacter*, *Hyphomicrobium*, *Rubrobacteridae* (α -proteobacterias); *Nitrosospira*, *Hydrogenophab*, *Azonexus*, *Acetobacterium* (β -proteobacteria); *Desulfovibrio* (δ -proteobacterias), *Acinetobacter*, *Marinobacter* y *Pseudomonas* (γ -proteobacteria) (Green et al., 2008, Li et al., 2008, Fry et al., 2009, Jones et al., 2010, Beckmann et al., 2011, Tang et al., 2012, Guo et al., 2012, Meslé et al., 2013, Gallagher et al., 2013, Singh y Tripathi, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1 Estudios de poblaciones microbianas asociadas a mantos de carbón, y su porcentaje de incidencia en la literatura (Green et al., 2008, Li et al., 2008, Fry et al., 2009, Jones et al., 2010, Beckmann et al., 2011, Tang et al., 2012, Guo et al., 2012, Meslé et al., 2013, Gallagher et al., 2013, Singh y Tripathi, 2013).

PHYLUM	GENERO	% DE
CLASE		INCIDENCIA
Actinobacteria	<i>Cellulomonas</i>	20
	<i>Microbacterium</i>	20
	<i>Rubrobacteridae</i>	20
α -Proteobacterias	<i>Hyphomicrobium</i>	20
	<i>Rhodobacter</i>	20
	<i>Sphingomona</i>	20
β -Proteobacteria	<i>Acetobacterium</i>	20
	<i>Azonexus</i>	20
	<i>Burkholderia</i>	20
	<i>Nitrosospira</i>	20
	<i>Hydrogenophab</i>	60
δ -Proteobacterias	<i>Desulfovibrio</i>	20

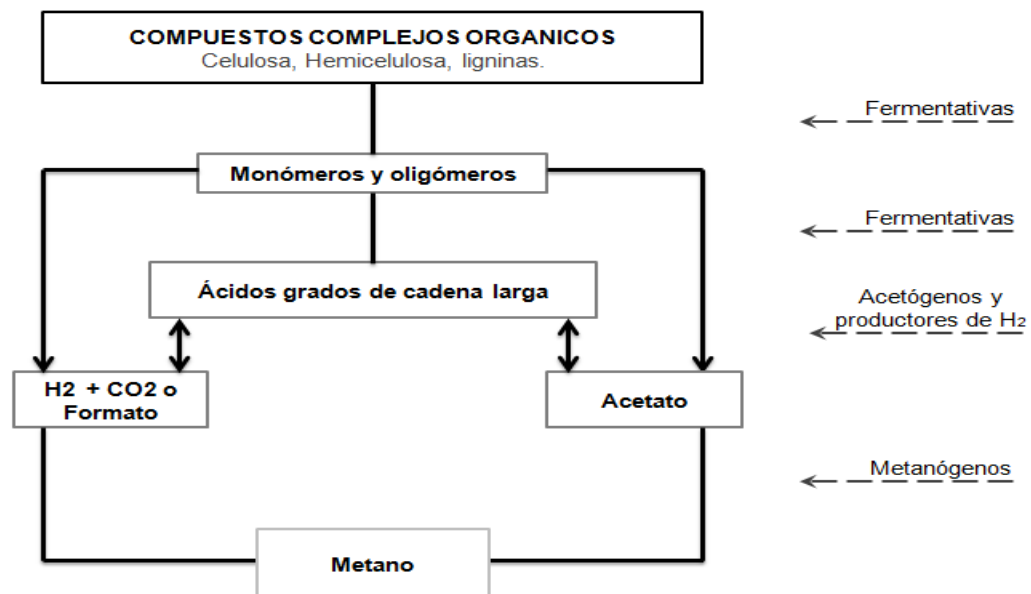
γ-Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	30
	<i>Marinobacter</i>	20
	<i>Pseudomonas</i>	60
ε-Proteobacteria	<i>Arcobacter</i>	20
Chloroflexi	<i>Chloroflexi</i>	20
Firmicutes	<i>Actinobacterium</i>	20
	<i>Geobacillus</i>	20
	<i>Syntrophomonas</i>	20
	<i>Bacillus</i>	30
	<i>Clostridium</i>	40
Spirochaetes	<i>Spirochaeta</i>	30
Tenericutes	<i>Acholeplasma</i>	30

La biodegradación es un proceso enzimático mediante el cual los polímeros del carbón se transforman en compuestos más simples, de bajo peso molecular, e hidrosolubles. Este proceso, involucra microorganismos que utilizan exoenzimas hidrolíticas (Faison et al., 1990, Jones et al., 2010, Strapoć et al., 2008). La biodegradación está limitada por barreras físico-químicas entre el sustrato y el microorganismos como son: niveles bajos de materia orgánica disuelta en las aguas meteóricas (Orem et al., 2010) y poca exposición superficial a los microorganismos (Faison et al., 1990, Scott et al., 1994). Microorganismos de los Phylum Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacterias y Firmicutes están relacionados con este mecanismo de degradación del carbón (Tabla 2).

En la Figura 1 se resume el proceso de biodegradación de los sustratos orgánicos complejos del carbón hasta metano, en el que participan eubacterias y arqueobacterias metanogénicas. 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 etapa del proceso, donde H₂, CO₂, 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.



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, 1998; 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; Gupta y Birendra, 2000; Green et al. 2008; Harris, 2008; Jones et al. 2008; Orem et al. 2010; Opara, 2012); soportando la factibilidad de tecnologías *ex situ* para la producción de metano a partir de carbón bituminoso de baja calidad comercial.

La minería de carbón genera grandes volúmenes de residuos sólidos de difícil eliminación (Binotto, 2000), constituyéndose como el combustible fósil más contaminante (Mehra et al., 1998). Esta problemática está presente en todas las etapas de producción del carbón, incluyendo accidentes por explosiones en minas de carbón, hundimientos de tierra, contaminación del agua por drenajes ácidos, contaminación del aire, producción de escombros, trastornos de la hidrogeología y producción de hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc. (Bian et al., 2010). En la actualidad, la mayor parte del carbón se quema para la generación de calor y electricidad.

La Bio-licuefacción es un proceso en el que se transforma el carbón en su estado sólido a una suspensión por medio de microorganismos, en donde participan hongos y bacterias (Quigley et al., 1989, Hatakka, 1994). Se ha reportado que hongos como: *Trichoderma atroviride*, *Fusarium oxysporum*, *Piptoporus betulinus*, *Nocardia rubra*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp*, *Streptomyces viridosporus* y *Trametes versicolor* y bacterias como *Pseudomonas cepacia*; llevan a cabo la licuefacción de carbón (Gupta et al., 1990, Osipowicz et al., 1994, Runnion y Combie, 1990, Ivanov, 2007). El método de licuefacción es comúnmente usado para la recuperación de tierras en zonas mineras, en donde el alto impacto de la

explotación a causados estragos en el área circundante, por los residuos sólidos producidos. Estas tierras, son recuperadas para realizar otras actividades productivas en la región.

Recientemente se ha propuesto que los mantos de carbón pueden actuar como sitios reservorios que secuestren CO₂ de origen ambiental; y que este puede ser convertido *in situ* en otros gases de valor industrial como el metano (Damen et al., 2005). Sin embargo, la baja porosidad de los mantos de carbón son una limitante importante para la extracción de tales gases (Mazumder et al., 2008). Una posible solución propuesta para saltar esta limitante, sería "solubilizar el mantos de carbón" mediante microorganismos biodegradadores de géneros como *Bacillus* y *Pseudomonas* (Polman et al., 1994, Jones et al., 2010, Strapoć et al., 2008; Singh y Tripathi, 2013); lo cual permitiría incrementar la permeabilidad del manto y aumentar la recuperación de gas (Strapoć et al., 2008). Los Biosulfactantes que producen tales microorganismos juegan un papel central en este proceso de solubilización. Tales compuestos incrementan la solubilidad de carbón en agua, reduciendo su tensión superficial, incrementando el área superficial y regulando la unión y desprendimiento de los microorganismos a superficies (Fakoussa y Hofrichter, 1999, Yuan et al., 2006, Pieper y Reineke, 2000). Los Biosulfactantes tienen varias aplicaciones potenciales en la industria del carbón entre las que se encuentran: *i*) control de polvo de carbón, *ii*) mejorar la permeabilidad de los mantos de carbón, *iii*) eliminación de cenizas de carbón y, *vi*) bio-remediación de suelos (Singh y Tripathi, 2013; Stelmack et al., 1999).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son otro tipo de compuesto que forman parte de la composición química del carbón; siendo las plantas de producción de coque para la industria metalúrgica las fuente de mayor contaminación. Muchos HAP y sus epóxidos son altamente tóxicos, mutagénicos

y/o carcinogénicos para procariontas y sistemas superiores, incluyendo los humanos. La aplicación de biotecnologías usando microorganismos biodegradadores de carbón tiene enorme potencial para mitigar el efecto tóxico de los HAP. Sin embargo, la eficiencia a la que ocurre naturalmente la biorremediación debe mejorarse significativamente mediante la optimización de ciertos factores como la bio-accesibilidad del carbón (Samanta et al., 2002).

Se han caracterizado enzimas capaces de realizar la degradación de hidrocarburos (HAP). La primera enzima reportada capaz de romper los anillos aromáticos de los HAP fue la Dioxin dioxygenase en *Sphingomonas* sp (Armengaud et al., 1998; Pieper y Reineke, 2000). Esta enzima, ha sido reportada posteriormente en géneros de bacterias como *Pseudomonas* y *Rhodococcus* (Cerniglia, 1993, Mueller et al., 1996, Bamforth y Singleton, 2005). Unas pocas bacterias del género *Mycobacterium* también son capaces de oxidar los HAP por la acción de la enzima citocromo monooxigenasa P450 (Kelley y Cerniglia, 1995). Además, en la actualidad alrededor de 20 géneros bacterianos han sido reportados como degradadores de HAP (ver Tabla 2).

Tabla 2 Géneros microbianos asociados a la biodegradación de algunos hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP). (Samanta et al., 2002, Hedlund et al., 1999, Kiyohara y Nagao, 1978, Bastiaens et al., 2000, Kanaly y Harayama, 2000, Juhasz et al., 2000).

Hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP)

GÉNEROS

Naftaleno Fenaltreno Fluoreno Criseno Pireno

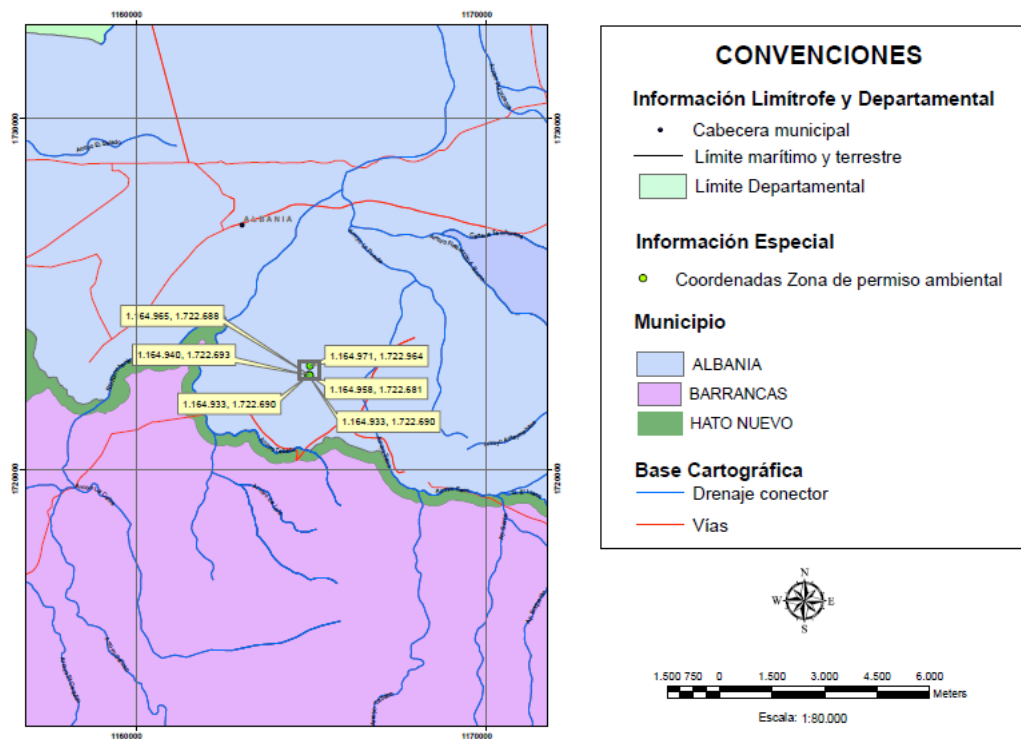
	Naftaleno	Fenaltreno	Fluoreno	Criseno	Pireno
<i>Aeromonas</i>		+			
<i>Alcaligenes</i>	+	+			
<i>Bacillus</i>	+	+			
<i>Beijerinckia</i>		+			
<i>Cyclotrophicus</i>	+				
<i>Flavobacterium</i>		+			
<i>Gardona</i>			+	+	+
<i>Micrococcus</i>		+			
<i>Moraxella</i>	+				
<i>Mycobacterium</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>					
<i>Polychromogenes</i>		+			
<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+
<i>Sphingomonas</i>	+				
<i>Stenotrophomonas</i>			+		
<i>Streptomyces</i>	+				
<i>Venale</i>	+				
<i>Vibrio</i>	+				

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo

El área de estudio se encuentra ubicada dentro del perímetro de explotación de la mina de carbón Cerrejón. La mina se ubica en el municipio de Albania perteneciente al departamento de la Guajira; en la región conocida como la "Baja Guajira" con la Sierra Nevada de Santa Marta hacia el occidente y la Serranía de Perijá al oriente (Figura 2).

Figura 2. Mapa zona de muestreo, Cerrejón, Guajira Colombia



En los puntos de muestreo (estaciones) se colectaron tres tipos de muestras: una correspondiente a carbón tomada a partir de un núcleo del manto subterráneo y otras dos obtenidas en la laguna de oxidación asociada al yacimiento carbonífero correspondiente a muestras de agua y lodo; (Figura 3). Las coordenadas exactas correspondientes a las muestras colectadas en el manto de carbón son presentadas en la Tabla 3. Todas la muestras fueron tomadas en frascos plásticos estériles (1 L) sellados con papel parafilm y conservadas a una temperatura entre 2-8°C hasta su análisis en el laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander.

Figura 3. Esquema representativo de la ubicación de las muestras de agua, lodo y carbón.

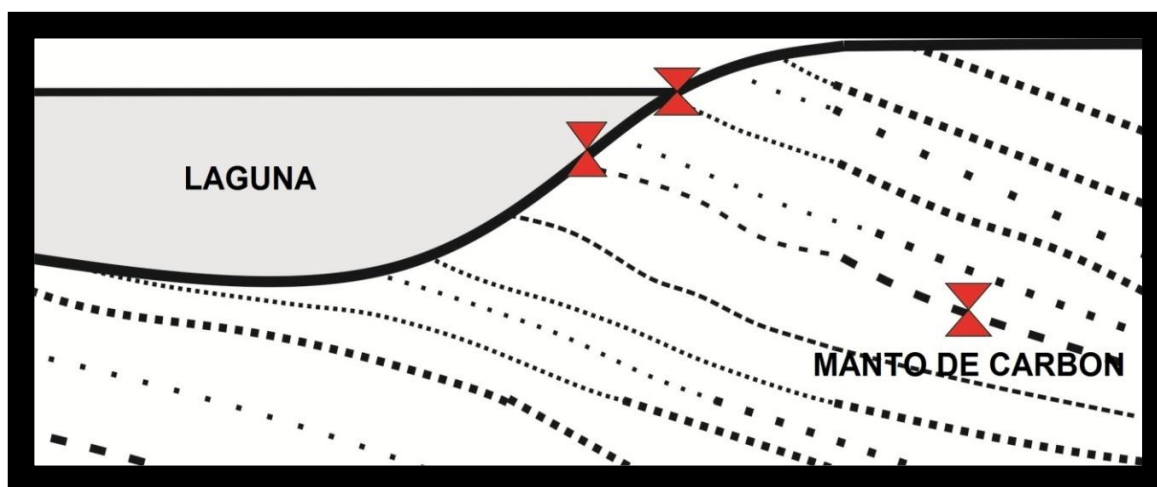


Tabla 3. Coordenadas de los puntos de muestreo.

MUESTRAS DE CARBÓN	COORDENADAS PLANAS			COORDENADAS GEOGRAFICAS		
	X	Y	Z	X	Y	Z
Estación 1	1164958E	1722681N	32	11°7'46,96"N	72°34'15,25"E	32
Estación 2	1164971E	1722964N	32	11°7'56,17"N	72°34'15,25"E	32
Estación 3	1164933E	1722690N	22	11°7'47,25"N	72°34'16,07"E	22
Estación 4	1164940E	1722693N	23	11°7'47,35"N	72°34'15,84"E	23
Estación 5	1164933E	1722690N	22	11°7'47,25"N	72°34'16,07"E	22
Estación 6	1164965E	1722688N	23	11°7'47,18"N	72°34'15,02"E	23

Origen de coordenadas:
GAUSS_BTA_MAGNA. Projection: Transverse_Mercator, False_Easting: 1000000,000000,

2.2 Medios de cultivo y cepas de referencia

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 de cultivo (ver Tabla 4): medio RCM (de sus siglas en inglés Reinforced Clostridial Medium, (OXOID), Caldo Nutritivo y el Medio Mínimo de Sales M9 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con diferentes fuentes de carbono como: 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) y el medio TERRIFICT Broth. 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.

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
NA	Peptona 5g, Extracto de carne 3g, pH: 7.0 ± 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 médium, **NA:** Caldo nutritivo.

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 (Quillardet et al. 1982) se utilizó como control positivo en la prueba de la β -galactosidasa.

2.3 Aislamientos de microorganismos a partir de las muestras

Con el fin de aislar un amplio rango de especies microbianas cultivables a partir de las muestras de agua, lodo y carbón, se usaron métodos estándar (filtración, diluciones, entre otros) combinados con los medios de enriquecimiento ya mencionados, para el aislamiento de grupo microbianos presentes en estos ambientes (Harris, 2008; Orem et al., 2010). Todos los cultivos se desarrollaron tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias.

Para el aislamiento de microorganismos aerobios o facultativos a partir de las muestras de carbón de los diferentes puntos de muestreo, el procedimiento realizado fue el siguiente: aproximadamente 0.5 g de carbón previamente esterilizado externamente en alcohol al 70 % durante 20 minutos, fueron macerados en morteros estériles hasta que se obtuvo un polvo fino. El polvo de carbón se usó como inóculo de tubos Pirex conteniendo los medios caldo nutritivo y M9; este último suplementado con una fuente de vitamina (extracto de levadura) y diferentes fuentes de carbono (acetato, glucosa, etanol, metanol, isopropanol, glicerol). Los tubos Pirex fueron desoxigenados y sellados con papel parafilm e incubados por 8 días a una temperatura de 37°C. Posteriormente, cuando se observó crecimiento se realizaron diluciones seriadas en Buffer Fosfato (0.1M) suplementado con 1% de Octil Fenol Etoxilato, las cuales fueron sembradas en medio fresco. Por su parte, las muestras de agua y lodo se diluyeron directamente

en Buffer Fosfato (0.1M) suplementado con 1% de Octil Fenol Etoxilato, se sembraron en tubos Pirex conteniendo el mismo medio M9 suplementado, se sellaron con papel parafilm y se incubaron por 8 días a una temperatura de 37°C. Finalmente, la pureza de las colonias obtenidas se comprobó mediante su propagación en medio fresco y por microscopia usando tinción de Gram. El criterio de pureza fue la homogeneidad de forma en una tinción de Gram (Brenner DJ, 2005).

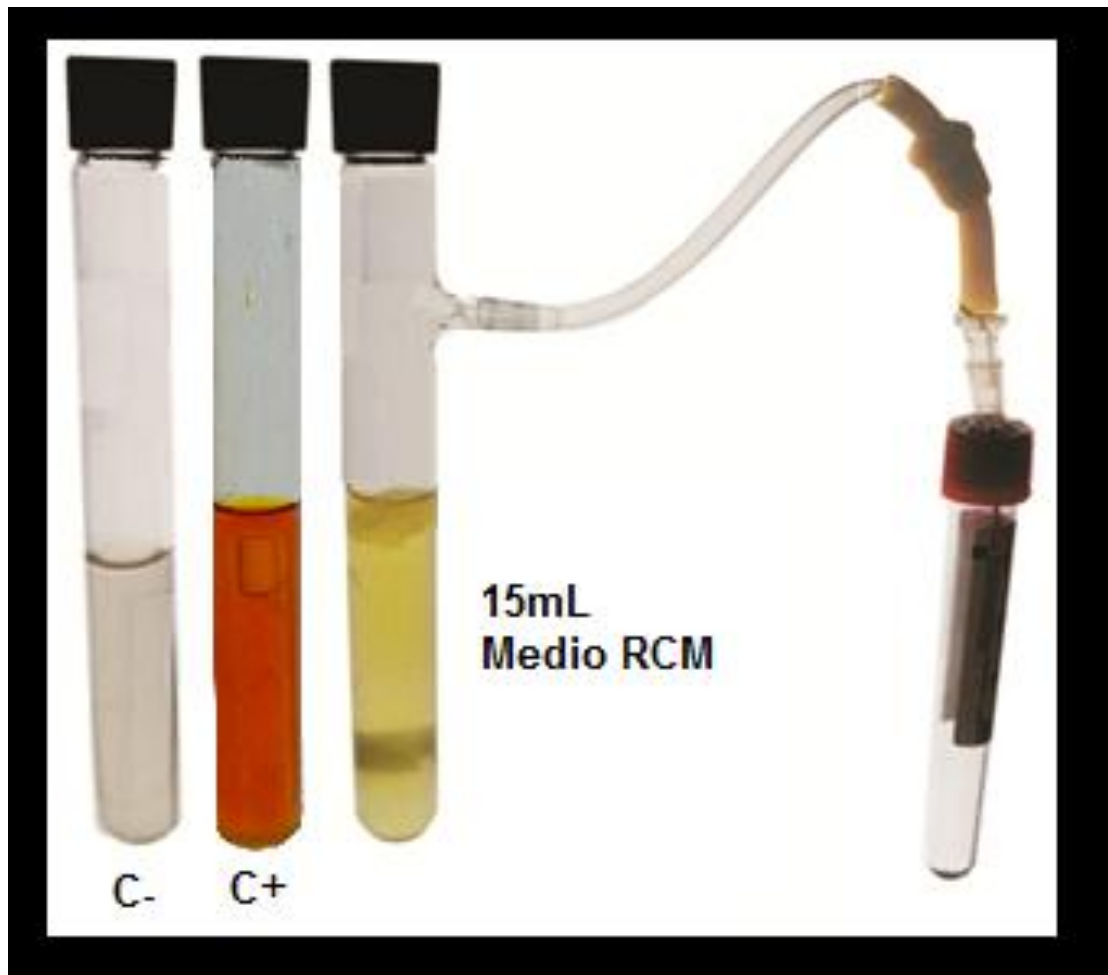
2.4 Aislamientos de microorganismos productores de gas a partir de las muestras de carbón

El aislamiento de microorganismos productores de gas a partir de muestras de carbón, se llevó a cabo en medio carbonatado RCM usando una variante del método del número más probable. El procedimiento desarrollado fue el siguiente: muestras de carbón de aproximadamente $0.5g \pm 0.06$ fueron sumergidos en etanol al 70% durante 20 minutos, secados y triturados en morteros estériles, y agregados en tubos Pirex conteniendo 20 mL del medio RCM y tubos Durham invertidos para capturar los gases producidos (Figura 4). Los tubos Pirex fueron sellados con papel parafilm e incubados por 15 días a una temperatura de 37°C, bajo las condiciones de crecimiento anaerobio dentro de un Sistema OXOID generador de anaerobiosis (OXOID Ltd, Cambridge, Reino Unido).

Aquellos tubos que mostraron producción de gas se usaron para el aislamiento de los microorganismos. Para ello, se desarrollaron diluciones seriadas tal como se mencionado anteriormente y estas 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. Durante el proceso de purificación de los microorganismos, los cultivos fueron incubados a

37°C durante 24-72 horas bajo las condiciones de anaerobiosis ya mencionadas por Mayorga (2012).

Figura 4 Bio-reactores usados para producción de gas a partir de muestras de carbón.



2.5 Conservación de las estirpes microbianas

Para la conservación de la colección de aislados, se realizaron cultivos frescos en el medio original del cada aislamiento; los cuales se incubaron a 37 °C durante 12 horas. La pureza de cada cultivo se comprobó mediante tinción de Gram. Seguidamente, se mezclaron 1,4 ml del cultivo con 0,6 ml de glicerol en un tubo Pirex estéril, de tal forma que la concentración final de glicerol en el medio fuese del 30%. Finalmente, se vertieron 300 µL de la mezcla en crioviales que contenían 0.5 mg de Zeolita previamente esterilizada. Los aislados conservados fueron almacenados a una temperatura de -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 DJ, 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 Xlstat (versión 54.6 MB, Addinsoft SARL, Paris, Francia).

2.8 Ensayo de producción y determinación de gas biogénico

Los cultivos de microorganismos aislados a partir de carbón, en los cuales se evidenció producción de gas por medio de la campana Durham, fueron seleccionados para desarrollar bioensayos en bio-reactores que permiten conocer la composición de la mezcla de gases producidos (Figura 4). Para ello, muestras de carbón promisorias fueron inoculadas en bio-reactores conteniendo 15 mL de medio RCM carbonatado. Los 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 dos replicas y los controles positivos y negativos para la producción de gas. El control positivo consistió de un tubo Pirex 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

4). Los bio-reactores fueron incubados durante 30 días y replicados a dos temperaturas (37° y 60°C).

La composición del gas producido en los bio-reactores se determinó mediante una 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 Universidad Industrial de Santander. 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 3µm) y de tamiz molecular (30m X 0.53mm X 50µm) 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. Para cada bio-reactor, se analizaron la composición de gases de dos ensayos independientes.

3. RESULTADOS

3.1 Descripción de colección de aislados

En el presente estudio se desarrolló una colección de 82 aislados microbianos provenientes de muestras de agua, lodo y de un manto de carbón colectados en la mina a cielo abierto “Cerrejón”, del departamento La Guajira, Colombia. Como se indica en la Tabla 5, el número de aislados microbianos disminuyó en las diferentes muestras como sigue: lodo (36) > agua (30) > manto de carbón (16).

Tabla 5 Número de aislados microbianos obtenidos a partir de muestras de diferentes orígenes en el complejo minero Cerrejón y medios de cultivos.

MEDIO DE CULTIVO [†]	ORÍGENES DE LAS MUESTRAS			TOTALES
	WGS	MGS	UC	
NA	5	7	0	12
M9Y	0	16	12	28
M9YGlu	10	8	0	18
M9YGly	15	5	0	20
RCM	0	0	4	4
SUBTOTALES	30	36	16	82

(†) La composición de los medios de cultivos fue indicada en la Tabla 2. **WGS**: Muestras de Agua del Surtidero de Gas; **MGS**: Muestras de Lodo del Surtidero de Gas; **UC**: Muestras del Manto de Carbón subterráneo. **NA**: Medio Agar Nutritivo; **M9Y**: medio mínimo de sales M9 + extracto de levadura; **Glu**: Glucosa; **Gly**: Glicerol; **RCM**: medio Clostridium.

El esquema de aislamiento establecido permitió obtener tanto bacterias Gram positivas y Gram negativas a partir de las diferentes muestras estudiadas; las cuales mostraron diferentes formas como bacilos (79) y cocos (3). Detalles sobre estas formas celulares pueden encontrarse en el Anexo 1.

La gran mayoría de los aislados resultaron microorganismos heterótrofos capaces de crecer en medios ricos en nutrientes como el Agar Nutritivo (12 aislados) o que utilizan glicerol (20 aislados) o glucosa (18 aislados) como fuentes de carbono. Una fracción no menos importante (28 aislados), fueron microorganismos capaces de crecer en el medio M9Y sin una fuente de carbono convencional; aunque no se descartó que estos microorganismos utilicen el extracto de levaduras como una fuente de carbono. Una fracción más pequeña (4 aislados), crecieron en el medio RCM. Vale destacar, que no se encontró crecimiento microbiano en medio M9Y suplementado con otras fuentes de carbono como: acetato, etanol, metanol o propanol (datos no mostrados). El metabolismo en relación con el oxígeno de la colección de aislados se comportó como sigue: anaerobios facultativos (67) > aerobios estrictos (15) > anaerobios estrictos (0).

3.2 Grupos metabólicos de la colección de aislados

Con el fin de conocer el perfil metabólico de la colección de aislados microbianos, se desarrollaron diferentes pruebas morfológicas, fisiológicas y del metabolismo de cada aislado (Anexo 3). De las 44 pruebas desarrolladas, 27 variables resultaron informativas mostrando variabilidad en la colección de aislados. Un Análisis de Correlación de Pearson permitió descartar información redundante en la matriz de datos; la cual resultó en 24 variables no correlacionadas entre sí (ver Anexo 3).

Adicionalmente, un Análisis de Componentes Principales (ACP) desarrollado con estas 25 variables permitió identificar aquellas que más contribuyen a la variabilidad de la colección (Tabla 6). El análisis de los valores propios (aquellos ≥ 1) y de las contribuciones del ACP indicó que los 10 primeros componentes explicaron el 74% de la variabilidad de todo el sistema; dado principalmente por la

contribución de 18 variables. Estas son las siguientes: en el componente 1, respuesta a la tinción de Gram (G.P) y crecimiento en Citrato Simmons (Cit); en el componente 2, forma cocoide (C) y forma bacilar (B); en el componente 4, presencia enzima oxidasa (Oxi); en el componente 5, presencia de enzima hidrolítica DNA medido por el medio DNAsa agar (DNA) y crecimiento a 65⁰C (C65⁰C); en el componente 6, presencia de enzima ureasa (Ure); en el componente 7, crecimiento anaeróbico (Cana) y Licuefacción de gelatina (Gel); en el componente 8, prueba rojo de metilo (Rm) y crecimiento 50⁰C (C50⁰C); en el componente 9, crecimiento aeróbico (Cae), método tinción de esporas Schaeffer-Fulton (S.F) y fermentación del lactosa medida por producción de ácido (laca); y finalmente en el componente 10, prueba Voges-Proskauer (Vp).

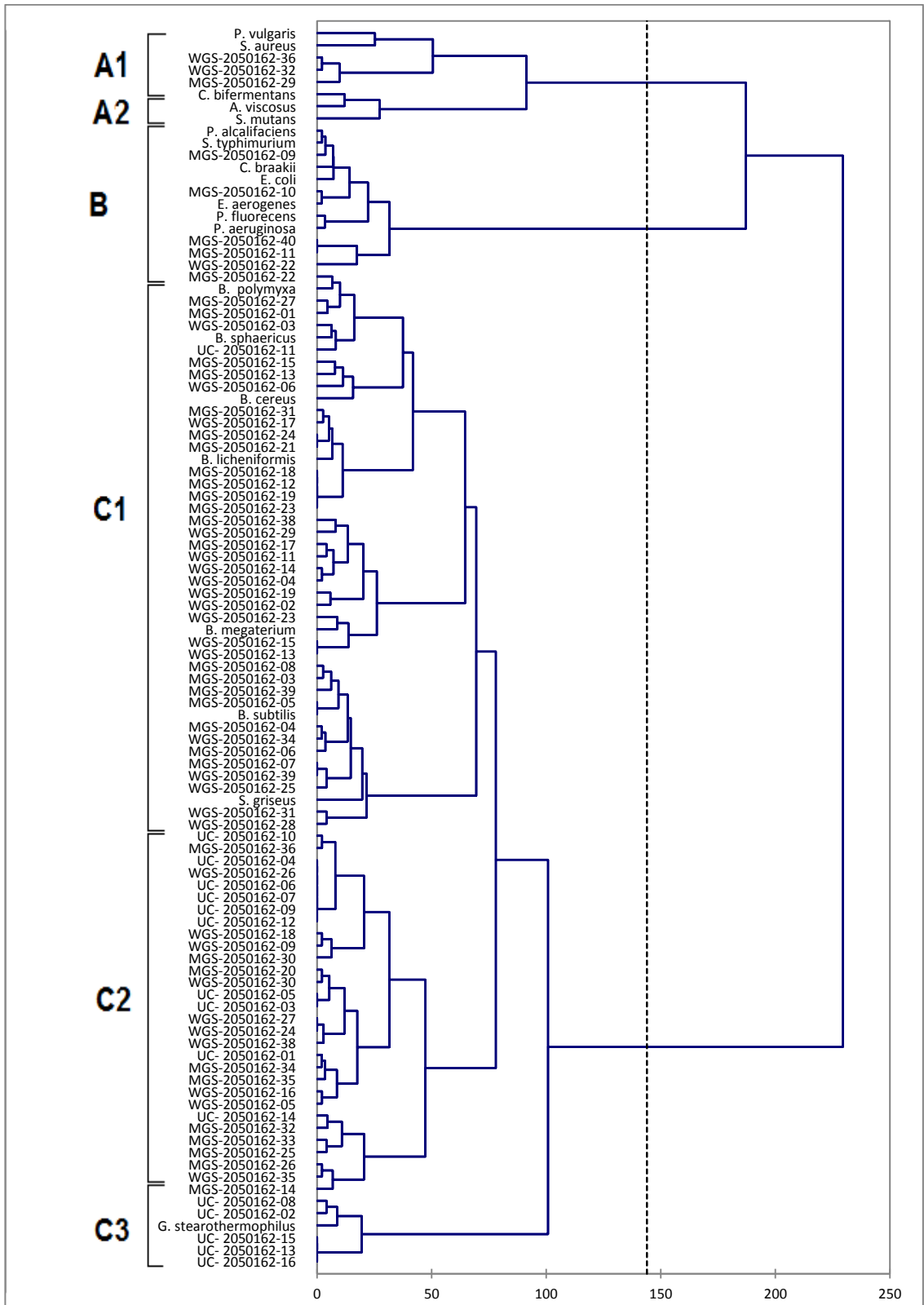
Tabla 6. Valores propios. Contribución de las variables a cada componente y variables de media contribución a la variabilidad total del análisis de componentes principales.

	COMPONENTES									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Valor propio	3,5	2,9	2,1	1,9	1,7	1,4	1,2	1,1	1,0	1,0
Contribución por componentes (%)	14,7	12,0	8,6	7,9	7,0	5,7	5,1	4,6	4,3	4,2
Contribución acumulada (%)	14,7	26,7	35,3	43,2	50,2	55,9	61,0	65,7	70,0	74,2
VARIABLES										
G.P	0,4	0,0	0,1	-0,1	-0,2	0,2	-0,1	0,0	-0,1	0,0
S.F	0,3	0,1	0,0	0,1	-0,1	-0,1	0,3	0,2	0,4	0,0
B	0,0	0,5	0,0	0,1	0,2	-0,2	0,1	-0,1	0,1	-0,2
C	0,0	-0,4	0,0	-0,1	-0,1	0,3	-0,2	0,1	0,1	0,3
Cae	0,0	0,4	-0,1	-0,2	0,0	0,0	-0,2	-0,1	0,5	0,2
Cana	0,0	-0,1	0,3	-0,2	0,0	0,1	0,5	-0,1	0,2	0,3
Cat	-0,1	0,3	-0,3	-0,2	-0,2	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	0,0
Oxi	0,1	0,3	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	0,2

Mc2	-0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	-0,2	0,2
Cit	-0,4	0,0	0,0	0,1	0,1	-0,2	0,1	0,3	-0,1	0,3
Rm	-0,2	0,0	-0,1	-0,2	-0,2	0,0	0,2	0,4	0,2	-0,1
Vp	0,2	0,3	0,1	-0,1	0,1	0,0	0,2	-0,3	0,0	0,4
Ur	-0,1	0,0	-0,2	-0,2	0,3	0,4	0,0	-0,2	-0,1	0,0
Gel	0,1	0,0	-0,3	-0,1	-0,3	-0,2	0,5	-0,1	-0,3	0,0
Ms2	0,1	0,2	-0,3	-0,3	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	-0,1	0,3
Dna	0,0	0,0	-0,2	-0,3	0,4	0,2	0,1	-0,1	0,0	-0,2
Alm	0,1	0,2	-0,2	-0,1	0,0	0,3	0,2	0,5	-0,1	-0,2
C50oc	0,3	0,0	0,3	-0,2	0,0	-0,2	-0,1	0,0	-0,2	-0,1
C65oc	0,1	-0,1	0,3	-0,1	0,5	-0,2	0,1	0,1	0,0	-0,1
Laca	-0,2	0,1	0,3	0,1	-0,2	0,1	0,2	-0,2	-0,4	0,0
Glua	-0,2	0,2	0,3	0,0	-0,3	0,3	0,0	-0,1	0,1	-0,3
Susa	0,0	0,0	0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,1	-0,1	0,1	-0,1
Mala	-0,2	0,2	0,3	-0,3	-0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	-0,1
Glya	-0,3	-0,1	-0,2	0,0	-0,1	0,0	0,3	-0,3	0,2	-0,2

Estas 17 variables fueron usadas para calcular distancias fenotípicas (Euclidiana) entre los aislados de la colección cuya variabilidad fue representada mediante un análisis de conglomerados como grupos metabólicos de la colección (Figura 5). Los aislados se agruparon según su proximidad metabólica formando tres grupos principales, donde los grupos A y C contienen cada un 2 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 mantos de carbón.

Figura 5. Grupos metabólicos de la colección de aislados basados en distancias fenotípicas.



El Grupo A, contiene la totalidad de aislados Gram positivos con forma cocoide (3) de la colección y 5 cepas de referencia de las familias Actinomycetaceae, Clostridiaceae, Streptococcaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae, indicando la proximidad metabólica de los aislados a estos grupos bacterianos. Dentro de este grupo fueron identificados dos subgrupos. El subgrupo A1 conformado por los 3 aislados de forma cocoide y dos cepas de referencia, *Staphylococcus aureus* ATCC® 33592™ y *Proteus vulgaris* ATCC®33420™. Una representación sintética del grupo es como sigue: bacterias con metabolismo facultativo que llevan a cabo fermentación ácido mixta (RM) y a partir de manitol y sacarosa. Por su parte, el subgrupo A2 está conformado exclusivamente por 3 cepas de referencia (*Actinomyces viscosus* ATCC®15987, *Clostridium bifermentans* ATCC®10137 y *Streptococcus mutans* ATCC®25175).

El grupo B, está conformado por 5 aislados de la colección y por 7 cepas de referencia de la familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter aerogenes* ATCC®35029™, *Escherichia coli* JM101 ATCC®33876™, *Citrobacter braakii* ATCC®43162™, *Providencia alcalifaciens* ATCC®51902™, y *Salmonella typhimurium* ATCC®13311™) y 2 cepas pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC®10145™, *Pseudomonas fluorescens* ATCC®13525). Este grupo incluye las cepas Gram negativas de la colección; asimismo, se caracteriza por presentar forma bacilar, motilidad, poseen metabolismo facultativo y en su mayoría fermentan a partir de citrato, glucosa, lactosa y manitol, además es el único grupo tolerante a sales biliares.

El grupo C, el mejor representado de todos los grupos, contiene el 80 % de los aislados de la colección y 7 cepas de referencia pertenecientes a las familias Bacillaceae (6), Paenibacillaceae (1) y Streptomyetaceae (1). El grupo C está

conformado por: bacterias Gram positivas de forma bacilar, móviles, que poseen metabolismo facultativo, crecen a 50⁰C y llevan a cabo fermentación butanodiólica (VP) y a partir de manitol. El grupo en general no mostró preferencia por el origen de los aislados ni por el medio usado para su aislamiento.

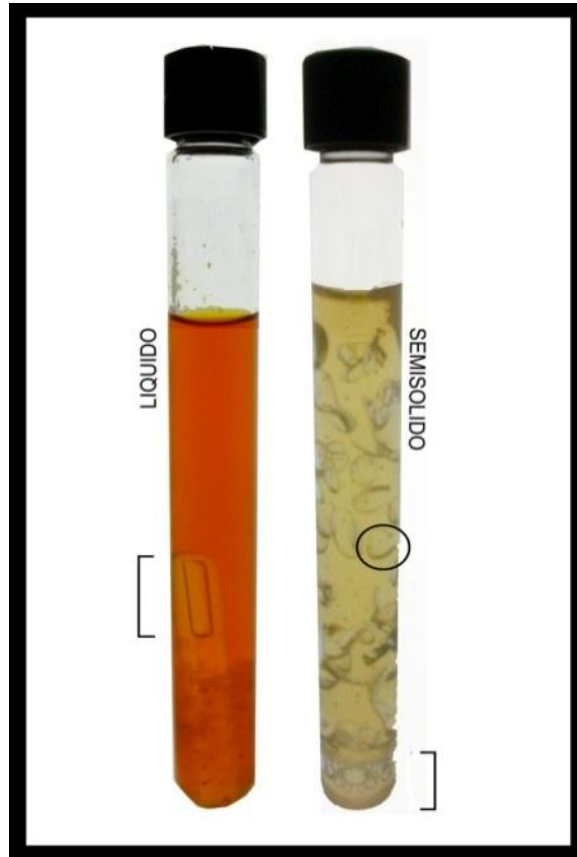
Tres subgrupos pueden ser identificados en este grupo (C1, C2 y C3). El subgrupo C1 contiene 39 aislados y 7 cepas de referencia de las familia Bacillaceae (*Bacillus cereus* ATCC®10876TM, *Bacillus megaterium* ATCC® 9885TM, *B. sphaericus* ATCC®4525, *B. subtilis* ATCC®6633, *B. licheniformis* ATCC®12759), *B. polimixa* ATCC®43865 de la familia Paenibacillaceae, y *Streptomyces griseus* ss. *Griseus* ATCC 10137TM de la familia Streptomycetaceae. Este subgrupo contiene las cepas que presentan actividad extracelular proteasa (Gel) y mayor capacidad fermentativa (ej: glucosa, sacarosa, y lactosa) en la colección. Además, al igual que el subgrupo C3, posee actividad enzimática extracelular por amilasas (Alm). El subgrupo C2, está conformado por 30 aislados, caracterizados por llevar a cabo fermentación a partir de glucosa y sacarosa; y al igual, que el subgrupo C3 crece a 65⁰C. Finalmente el subgrupo C3, contiene 5 cepas de la colección, aisladas a partir de carbón, y la cepa de referencia *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* ATCC®10149 de la familia Paenibacillus. Este subgrupo, además de las características ya descritas anteriormente se diferencia por ser el único grupo con actividad enzimática hidrológica de DNA (DNA) y tener baja una capacidad fermentativa.

3.3 Manto de carbón productor de gas biogénicos

Durante el desarrollo de la colección de aislados se constató la capacidad de algunas muestras de carbón, y de aislados microbianos provenientes de estos manto de carbón, para la producción de gas. Este proceso se pudo evidenciar tanto en los cultivos de medio líquido que contenían carbón (usando campana

Durjam invertida) como en los medios semisólidos que contenían las estirpes aisladas (fraccionamiento del agar y acumulación de gas) (Figura 6).

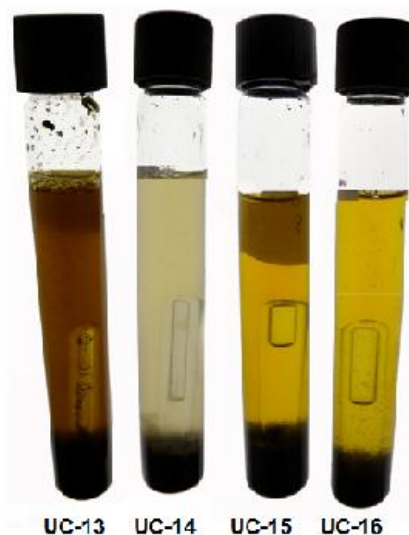
Figura 6. Acumulación de gas biogénico en medio líquido y semisólido.



Como ya indicamos, varios aislados microbianos (16) fueron obtenidos a partir de muestras del manto de carbón en estudio; pero solo 4 de ellos provienen de bio-reactores que producen gas biogénico en medio RCM. (Figura 7).

Figura 7. Producción de gas biogénico a partir de muestras del manto de carbón en estudio. Los bioreactores fueron preparados con las muestras de carbón esterilizadas superficialmente, trituradas y cultivadas en medio RCM.

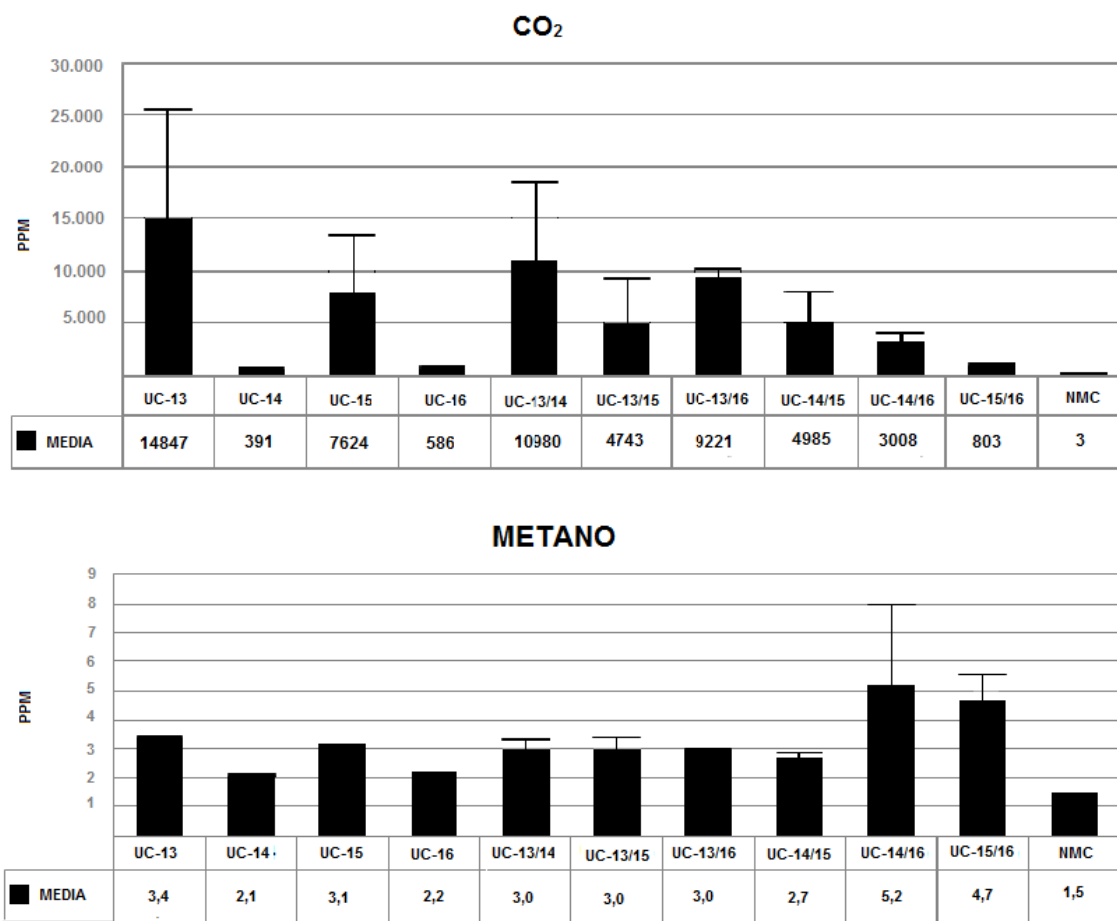
MUESTRA DE CARBON	REPLICA			Estirpe Microbiana aislada
	1	2	3	
Muestra 1	-			
Muestra 3	-	-	-	
Muestra 4	-	-	-	
Muestra 5	-	-	-	
Muestra 6	-	+	-	UC-16
Muestra 3 Techo	-	+	+	UC-13
Muestra 4 Techo	+	-		UC-14
Muestra 5 Techo	+	+		UC-15
Muestra 6 Techo	-	-		
Muestra 7 Base	-			
Muestra 8 Base	-	-	-	



Los 4 aislados microbianos (UC-13, UC-14, UC-15 y UC-16) obtenidos de las muestras productoras de gas biogénico fueron replicados independientemente en bio-reactores con medio RCM, y en combinación entre ellos (UC-13/UC-14, UC-13/UC-15, UC-13/UC-16, UC-14/UC-15, UC-14/UC-16 y UC-15/UC-16.); con el fin de conocer la composición del gas que ellos producen en dicho medio de cultivo. El gas producido en tales bio-reactores (tratamientos), fue sometido a un análisis de cromatografía de gases con un sistema de detección de ionización en llama (GC-FID). Se utilizó un patrón de gases cuyos tiempos de retención para CO₂ y CH₄ fueron de 2,65 y 7,713, respectivamente. Los perfiles cromatográfico para cada uno de los tratamientos y del patrón de gases pueden consultarse en el anexo 4.

Los valores promedios de concentraciones de CO₂ y CH₄ (en partes por millón, ppm) para cada tratamiento son presentados en la Figura 8.

Figura 8. Valores promedio de concentraciones de gas CO₂ y CH₄ producidas en bio-reactores con diferentes aislados microbianos y combinaciones de estos, con sus respectivas desviaciones estándar. Tratamientos: 1: UC-13, 2: UC-14, 3: UC-15, 4: UC-16, 5: Combinación UC-13/14, 6: Combinación UC-13/15, 7: Combinación UC-13/16, 8: Combinación UC-14/15, 9: Combinación UC-14/16, 10: Combinación UC-15/16. NMC: Nivel mínimo de cuantificación. Se incluyen los niveles mínimos de detección del equipo GC-FID.



Comparando con el nivel mínimo de cuantificación (3 ppm), los bio-reactores montados con los aislados UC-13 y UC-15 mostraron niveles de CO₂ relativamente altos (14847 y 7625 ppm, respectivamente); mientras UC-14 y UC-16 producen bajos niveles de este gas. Considerando que tanto UC-13 como UC-15 son aislados anaerobios facultativos con capacidad de degradar macromoléculas (ver anexo 1), ellos podrían fermentar macromoléculas del carbón

hasta moléculas más simples como el CO_2 . Aunque en diferentes proporciones, en general, los bio-reactores con los co-cultivos que contienen estos aislados producen menos CO_2 que los bio-reactores que contienen solamente UC-13 y UC-15; sugiriendo que en los co-cultivos el CO_2 es un metabolito consumido por los aislados UC-14 y UC-16.

Por su parte, los niveles detectados de CH_4 en los bio-reactores con los cuatro aislados estudiados (UC-13, UC-14, UC-15 y UC-16) fueron consistentemente bajos y muy próximos al nivel mínimo de cuantificación (1.5 ppm) del equipo. Solo los bio-reactores con co-cultivos de los aislados UC-14/UC-16 y de UC-15/UC-16; mostraron niveles significativamente mayores; pero aún sus valores son muy bajos. Estos resultados sugieren que el CH_4 posiblemente no sea el producto final de los consorcios que habitan este manto de carbón, pero se requerirá futuros estudios para dar datos conclusivos.

4. DISCUSIÓN

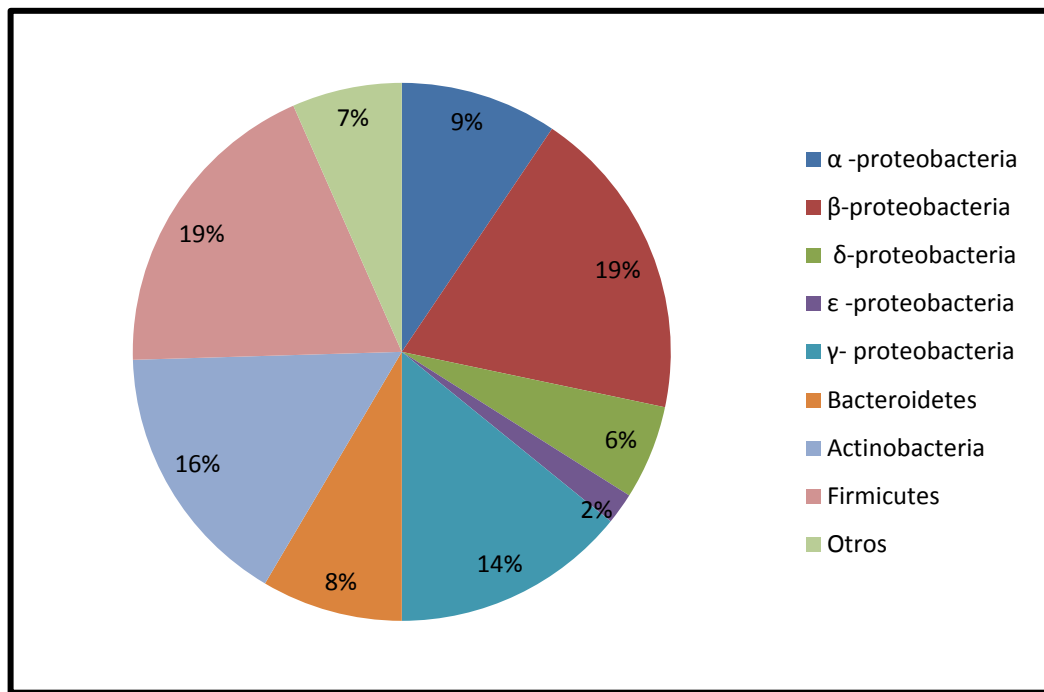
En el presente estudio se caracterizaron grupos metabólicos cultivables que conforman los consorcios microbianos que habitan en la mina de carbón Cerrejón (La Guajira, Colombia); y se determinó además, la relación de ciertos grupos metabólicos con la producción de gas biogénico en el manto de carbón estudiado.

Como se esperaba, la abundancia microbiana (en términos del número de aislados recuperados) disminuyó de la superficie al subsuelo profundo (manto de carbón). Así, la diversidad metabólica de las comunidades microbianas, medidas como el número de grupos metabólicos diferentes presentes en la laguna de oxidación y en el manto estudiado fue como sigue: Laguna de oxidación (A, B y C) y manto de carbón: (C); en correspondencia con lo observado en otras formaciones geológicas (Parkes et al., 2000; Fry et al., 2009; Mayorga, 2012); donde factores como la carencia de fuentes de energía, oxígeno y nutrientes adecuados son determinantes en dicho patrón. Estos resultados, unidos a la naturaleza meteórica de la laguna de oxidación estudiada, soportan la hipótesis donde las poblaciones microbianas que habitan mantos de carbón podrían estar fuertemente influenciadas por infiltraciones de agua que arrastran microorganismos desde la superficie hacia el subsuelo profundo (Scott et al. 1994).

Este estudio constituye un primer intento por conocer la composición de los consorcios microbianos cultivables que habitan en mantos de carbón de la mina Cerrejón (La Guajira, 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 (Figura 9). Tal es el caso, de aquellos grupos pertenecientes a las clases α -, β -, δ -

ϵ - γ -Proteobacterias, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes; en nuestro caso representadas por las familias Actinomycetaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Pseudomonadaceae y Rhizobiaceae (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; Shimizu et al., 2007; Strapoć et al., 2008; Tang et al., 2012).

Figura 9. Clases bacterianas mejor representadas en las comunidades microbianas de los mantos de carbón reportados en la literatura (Green et al., 2008; Li et al., 2008; Fry et al., 2009; Jones et al., 2010; Beckmann et al., 2011; Guo et al., 2012; Tang et al., 2012; Gallagher et al., 2013; Meslé et al., 2013).

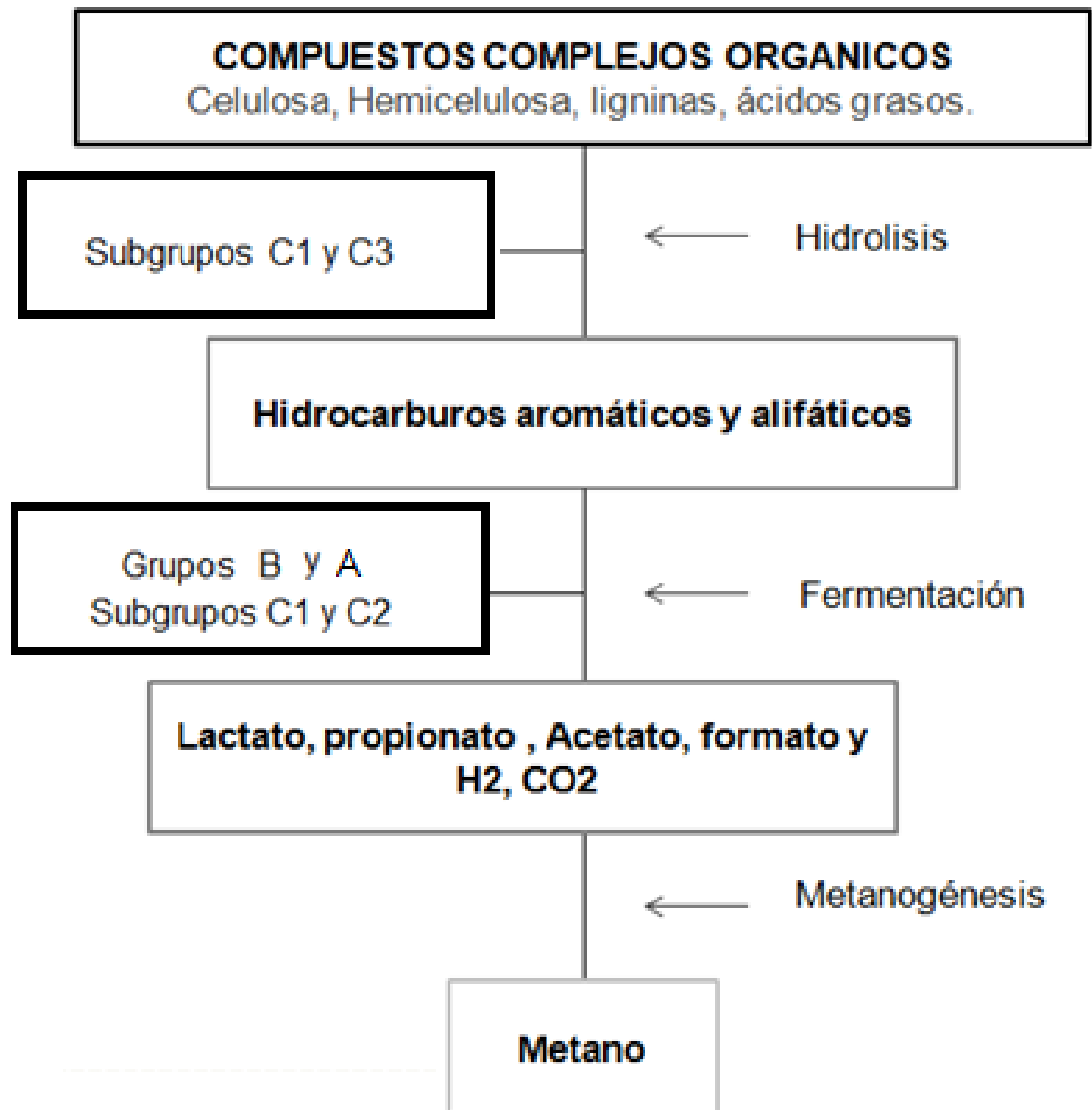


En el presente estudio se pudo cultivar exitosamente miembros de consorcios microbianos que habitan en los ambientes estudiados; así como, evidenciar su complejidad metabólica. Vale resaltar, que usando un medio mínimo de sales (M9) suplementados con las fuentes de carbono adecuadas (glicerol y glucosa), se pudo aislar microorganismos con alta capacidad fermentativa y de degradación de

macromoléculas como: ADN, almidón y proteínas. Por su parte, el uso del medio RCM usado mayormente para el recuento de microorganismos anaerobios estrictos esporulados (Hibsch y Grinsted, 1954), permitió el aislamiento de bacterias productoras de biogás a partir de carbón. 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 en la producción de biogás en el consorcio y finalmente su aislamiento exitoso (Figura 7).

La diversidad metabólica de la colección de aislados de este estudio, se asocia con ciclos geoquímicos que ocurren en mantos de carbón (Fry et al., 2009; Guo et al., 2012; Li et al., 2008; Okubo et al., 2006; Shimizu et al., 2007; Tang et al., 2012; Vandamme et al., 1991). Un modelo que trata de explicar la participación de aislados de la colección en dichos procesos de biodegradación es presentado en la Figura 10.

Figura 10. Modelo de degradación del carbón bituminoso para la producción de gas biogénico.



El grupo C es metabólicamente cercano al género *Bacillus*, siendo este género ampliamente documentado por poseer actividades enzimáticas extracelulares que permiten degradar las macromoléculas presentes en el carbón, como son: celulosa, hemicelulosa, ligninas y ácidos grasos (Green et al., 2008; Li et al., 2008; Tang et al., 2012; Meslé et al., 2013). Particularmente, se destacan los subgrupos

C1 y C3 por presentar actividades enzimáticas extracelulares por amilasa, proteasa e hidrólisis de ADN. Los subgrupos C1 y C2, además contiene aislados con alta capacidad fermentativa de azúcares más simples (glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa y manitol); por lo que los miembros de este grupo deben estar involucrados en la biodegradación de macromoléculas a moléculas más simples (ej: CO₂, H₂, acetato, formato) ya sea por vía fermentativa o oxidativa. Adicionalmente, el grupo B, metabólicamente próximo al género *Pseudomonas*, pudieran ser responsable de la biodegradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en el carbón a moléculas más simples (Machnikowska et al., 2002; Midgley et al., 2010; Li et al., 2008; Penner et al., 2010; Meslé et al., 2013; Shimizu et al., 2007; Strapoć et al., 2008). Por último, el grupo A resultó metabólicamente cercano al género *Staphylococcus*, el cual fue recientemente reportado en minas de carbón (Fry et al., 2009); aunque su actividad metabólica en este ecosistema es aún desconocida. Vale aclarar, que los aislados de la colección metabólicamente próximos a *Staphylococcus*, fueron obtenidos de lodos y agua de la laguna de oxidación estudiada; por lo que podría esperarse que su origen sea el ambiente superficial de la mina estudiada.

Lo anteriormente planteado, claramente evidencia que la vasta mayoría de los aislados de la colección son bio-degradadores presentes en minas de carbón. Ellos deben ser importantes en la fase inicial e intermedia del ciclo de biodegradación de carbón ilustrado en la Figura 10. Sin embargo, en el presente estudio no fue posible aislar archeobacterias metanogénicas; las cuales son claves para completar el mencionado ciclo de biodegradación del carbón mineral. Así el biogás producido a partir de muestras del manto de carbón estudiado (Figura 7) estuvo compuesto mayormente por CO₂ (Figura 8); el cual como indicamos es un producto intermedio o final del proceso.

La colección de aislados obtenida en el presente estudio puede resultar de utilidad para el desarrollo de estrategias de biodegradación; ya sea para la eliminación de contaminación ambiental o para la producción *in situ* de gas metano.

Como se conoce, la industria del carbón constituye uno de los principales contaminantes ambientales al nivel mundial (Mehra et al., 1998). En este contexto, se ha demostrado que las bacterias pertenecientes a los géneros *Acholeplasma*, *Acinetobacter*, *Athrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Fibrobacter*, *Microbacterium*, *Leifsonia*, *Pseudomonas*, *Spirochaeta*, *Syntrophomonas* y *Thermobifida*; las cuales degradan compuestos complejos del carbón (ej: celulosa, lignina y n-alcanos), pueden ser usadas en esquemas de biodegradación de residuos de carbón (Amaya-Delgado et al., 2010; Arvanitis et al., 2008; Bruce et al., 2010; Deng y Fong, 2011; Kerr et al., 1983; Grabowski et al., 2005; Green et al., 2008; Guo et al., 2012; Li et al., 2008; Machnikowska et al., 2002; Meslé et al., 2013; Midgley et al., 2010; Penner et al., 2010; Qiu et al., 2007; Saratale et al., 2010; Seo et al., 2006; Shimizu et al., 2007; Strapoć et al., 2008; Tang et al., 2012; Vandamme et al., 1991, Zhou et al., 2006). Adicionalmente, los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en los residuos del carbón son de persistencia prolongada en el ambiente debido su baja solubilidad en agua. Una posible forma de mejorar su descomposición, es el uso de microorganismos productores de biosulfactantes (tensioactivos) que permiten aumentar su área superficial y solubilidad y disminuir su tensión superficial (Pieper y Reineke, 2000; Singh y Tripathi, 2013); como son: *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas cepacia* (Gupta et al., 1990; Breckenridge y Polman, 1994; Polman et al., 1994). Los aislados de la colección representados en los grupos metabólicos B y C podrían ser de utilidad en esquemas de Bioremediación de ambientes contaminados con carbón mineral.

5. CONCLUSIONES

Los componentes bacterianos de los consorcios microbianos presentes en la mina Cerrejón (La Guajira, Colombia), muestran proximidad metabólica a miembros de las familias Actinomycetaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae y Streptomyetaceae. Esta diversidad metabólica es mayor al nivel de la superficie que en el manto del subsuelo profundo estudiado.

Las condiciones de cultivo aplicadas en los ensayos microbiológicos, resultaron adecuadas para el aislamiento de microorganismos que participan en los consorcios productores de gas biogénico; especialmente CO₂. Sin embargo, estas fueron insuficientes para el aislamiento de metanógenos.

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.

Ampliar los estudios sobre los consorcios microbianos involucrados en la metanogénesis en mantos de carbón, en especial, en lo referente al aislamiento de archeobacterias metanogénicas, responsables de la fase final de la biodegradación del carbón.

Realizar estudios encaminados a conocer las vías metabólicas de la degradación del carbón y de aceptores de electrones importantes para los consorcios involucrados en la generación de metano biogénico a partir de carbón bituminoso.

7. BIBLIOGRAFIA

Acumedia, 2010. Reinforced Clostridium medium Neogen Corporation 2.

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

Amaya-Delgado L ,Mejía-Castillo T ,Santiago-Hernández A ,Vega-Estrada J ,Amelia F-G-S ,Xoconostle-Cázares B ,Ruiz-Medrano R ,Montes-Horcasitas MdC, Hidalgo-Lara ME, 2010. Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cflxyn11A) from *Cellulomonas flavigena*. *Bioresource technology* 101, 5539-5545.

Armengaud J ,Happe B, Timmis KN, 1998. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome. *Journal of bacteriology* 180, 3954-3966.

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.

Bamforth SM, Singleton I, 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 723-736.

Bastiaens L ,Springael D ,Wattiau P ,Harms H ,Verachtert H, Diels L, 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and environmental microbiology* 66, 1834-1843.

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, 3749-3756.

Bian Z ,Inyang HI ,Daniels JL ,Otto F, Struthers S, 2010. Environmental issues from coal mining and their solutions. *Mining Science and Technology (China)* 20, 215-223.

Breckenridge CR, Polman JK, 1994. Solubilization of coal by biosurfactant derived from *Candida bombicola*. *Geomicrobiology Journal* 12, 285-288.

Brenner DJ KN, 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.

Bruce T ,Martinez IB ,Neto OM ,Vicente ACP ,Kruger RH, Thompson FL, 2010. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. *Microbial ecology* 60, 840-849.

Catcheside D, Ralph J, 1999. Biological processing of coal. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 16-24.

Cerniglia CE, 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 4, 331-338.

Cheng Y-H ,Sang S-X ,Huang H-Z ,Liu X-J, Ouyang J-B, 2007. Variation of Coenzyme F420 Activity and Methane Yield in Landfill Simulation of Organic Waste. *Journal of China University of Mining and Technology* 17, 403-408.

Damen K ,Faaij A ,van Bergen F ,Gale J, Lysen E, 2005. Identification of early opportunities for CO₂ sequestration—worldwide screening for CO₂-EOR and CO₂-ECBM projects. *Energy* 30, 1931-1952.

Deng Y, Fong SS, 2011. Laboratory evolution and multi-platform genome re-sequencing of the cellulolytic actinobacterium *Thermobifida fusca*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 39958-39966.

Faison B ,Woodward C, Bean R, 1990. Microbial solubilization of a preoxidized subbituminous coal. *Applied biochemistry and Biotechnology* 24, 831-841.

Fakoussa R, Hofrichter M, 1999. Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 25-40.

Fallgren PH ,Jin S ,Zeng C ,Ren Z ,Lu A, Colberg PJ, 2013. Comparison of Coal Rank for Enhanced Biogenic Natural Gas Production. *International Journal of Coal Geology*.

Formolo M ,Martini A, Petsch S, 2008. Biodegradation of sedimentary organic matter associated with coalbed methane in the Powder River and San Juan Basins, USA. *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, 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.

Gallagher LK ,Glossner AW ,Landkamer LL ,Figuroa LA ,Mandernack KW, Munakata-Marr J, 2013. The effect of coal oxidation on methane production and microbial community structure in Powder River Basin coal. *International Journal of Coal Geology*.

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

Grabowski A ,Nercessian O ,Fayolle F ,Blanchet D, Jeanthon C, 2005. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS microbiology ecology* 54, 427-443.

Green MS ,Flanegan KC, Gilcrease PC, 2008. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, USA. *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.

Gupta RK ,Deobald LA, Crawford DL, 1990. Depolymerization and chemical modification of lignite coal by *Pseudomonas cepacia* strain DLC-07. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24, 899-911.

Hatakka A, 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 125-135.

Hedlund BP ,Geiselbrecht AD ,Bair TJ, Staley JT, 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 251-259.

Hibsch A, Grinsted 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.

Ivanov I, 2007. Main trends in the biotechnological processing of coals: A review. *Solid Fuel Chemistry* 41, 3-10.

Jones EJ ,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, 7013-7022.

Juhasz AL ,Stanley GA, Britz ML, 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology* 30, 396-401.

Kanaly RA, Harayama S, 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182, 2059-2067.

Kelley I, Cerniglia CE, 1995. Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium strain* PYR-1. *Soil and Sediment Contamination* 4, 77-91.

Kerr TJ ,Kerr RD, Benner R, 1983. Isolation of a bacterium capable of degrading peanut hull lignin. *Applied and environmental microbiology* 46, 1201-1206.

Kiyohara H, Nagao K, 1978. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *Journal of General Microbiology* 105, 69-75.

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.

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.

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

Machnikowska H ,Pawelec K, Podgórska A, 2002. Microbial degradation of low rank coals. *Fuel Processing Technology* 77, 17-23.

Martínez Y, 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).

Mayorga CM, 2012. Caracterización microbiológica de consorcios microbianos asociados a la formación guaduas (cundinamarca, colombia). Tesis de grado. Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander (UIS).

Mazumder S ,Wolf K ,Van Hemert P, Busch A, 2008. Laboratory experiments on environmental friendly means to improve coalbed methane production by carbon dioxide/flue gas injection. *Transport in porous media* 75, 63-92.

Mehra A ,Farago M, Banerjee D, 1998. Impact of fly ash from coal-fired power stations in Delhi, with particular reference to metal contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* 50, 15-35.

Meslé M ,Dromart G, Oger P, 2013. Microbial methanogenesis in subsurface oil and coal. *Research in Microbiology* 164, 959-972.

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.

Moore TA, 2012. Coalbed methane: A review. *International Journal of Coal Geology*.

Mueller JG ,Cerniglia C, Pritchard PH, 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Research Series* 6, 125-194.

Okubo Y ,Futamata H, Hiraishi A, 2006. Characterization of phototrophic purple nonsulfur bacteria forming colored microbial mats in a swine wastewater ditch. *Applied and environmental microbiology* 72, 6225-6233.

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.

Osipowicz B ,Jabłoński L ,Siewiński A ,Jasieńko S, Rymkiewicz A, 1994. Biodegradation of hard coal and its organic extract by selected microorganisms. Fuel 73, 1858-1862.

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.

Pieper DH, Reineke W, 2000. Engineering bacteria for bioremediation. Current Opinion in Biotechnology 11, 262-270.

Polman JK ,Miller KS ,Stoner DL, Breckenridge CR, 1994. Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 61, 11-17.

Qiu F ,Huang Y ,Sun L ,Zhang X ,Liu Z, Song W, 2007. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. International journal of systematic and evolutionary microbiology 57, 405-408.

Quigley D ,Ward B ,Crawford D ,Hatcher H, Dugan P, 1989. Evidence that microbially produced alkaline materials are involved in coal biosolubilization. Applied Biochemistry and Biotechnology 20, 753-763.

Runnion K, Combie JD, 1990. Thermophilic microorganisms for coal biosolubilization. Applied Biochemistry and Biotechnology 24, 817-829.

Samanta SK ,Singh OV, Jain RK, 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology* 20, 243-248.

Saratale GD ,Saratale RG ,Lo YC, Chang JS, 2010. Multicomponent cellulase production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and its applications for cellulosic biohydrogen production. *Biotechnology progress* 26, 406-416.

Scott AR ,Kaiser W, Ayers Jr WB, 1994. Thermogenic and secondary biogenic gases, San Juan Basin, Colorado and New Mexico-Implications for coalbed gas producibility. *AAPG Bulletin (American Association of Petroleum Geologists);(United States)* 78.

Seo J-S ,Keum Y-S ,Hu Y ,Lee S-E, Li QX, 2006. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1 : Initial 1,2-, 3,4-and 9,10-dioxygenation, and meta-and ortho-cleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids. *Chemosphere* 65, 2388-2394.

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.

Singh DN, Tripathi AK, 2013. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. *Bioresource Technology* 128, 215–221.

Stach E, Murchison D, 1975. *Stach's Textbook of Coal Petrology: With 39 Tables in Text*. Borntraeger.

Stelmack PL ,Gray MR, Pickard MA, 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. Applied and environmental microbiology 65, 163-168.

Strąpoć D ,Picardal FW ,Turich C ,Schaperdoth I ,Macalady JL ,Lipp JS ,Lin Y-S ,Ertefai TF ,Schubotz F, Hinrichs K-U, 2008. Methane-producing microbial community in a coal bed of the Illinois Basin. Applied and environmental microbiology 74, 2424-2432.

Tang Y-Q ,Ji P ,Lai G-L ,Chi C-Q ,Liu Z-S, Wu X-L, 2012. Diverse microbial community from the coalbeds of the Ordos Basin, China. International Journal of Coal Geology 90, 21-33.

Vandamme P ,Falsen E ,Rossau R ,Hoste B ,Segers P ,Tytgat R, De Ley J, 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 41, 88-103.

Volkering F ,Breure A, Rulkens W, 1997. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation 8, 401-417.

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

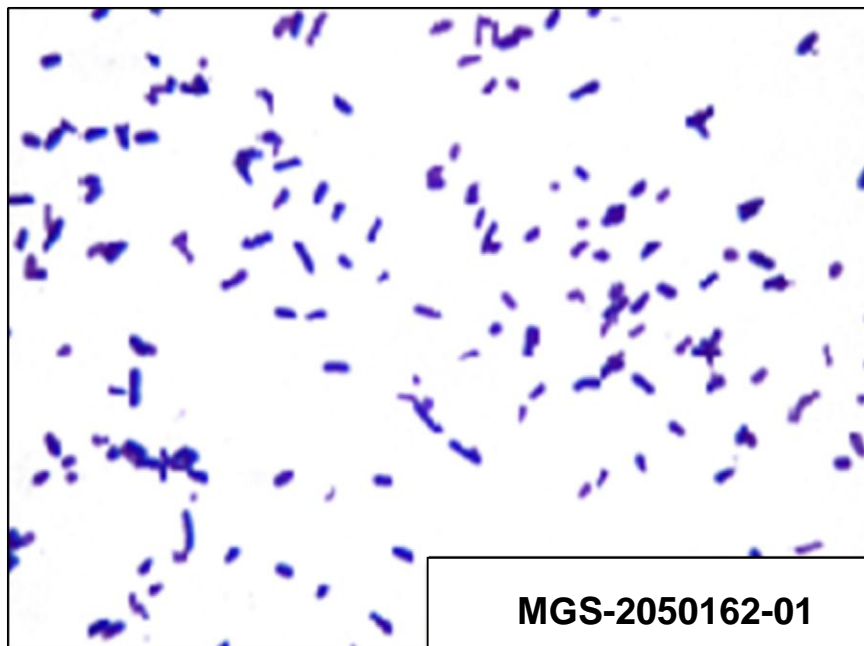
Whitman WB ,Coleman DC, Wiebe WJ, 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 6578-6583.

Yuan H ,Yang J, Chen W, 2006. Production of alkaline materials, surfactants and enzymes by *Penicillium decumbens* strain P6 in association with lignite degradation/solubilization. Fuel 85, 1378-1382.

Zhou HW ,Guo CL ,Wong YS, Tam NFY, 2006. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. FEMS microbiology letters 262, 148-157.

ANEXOS

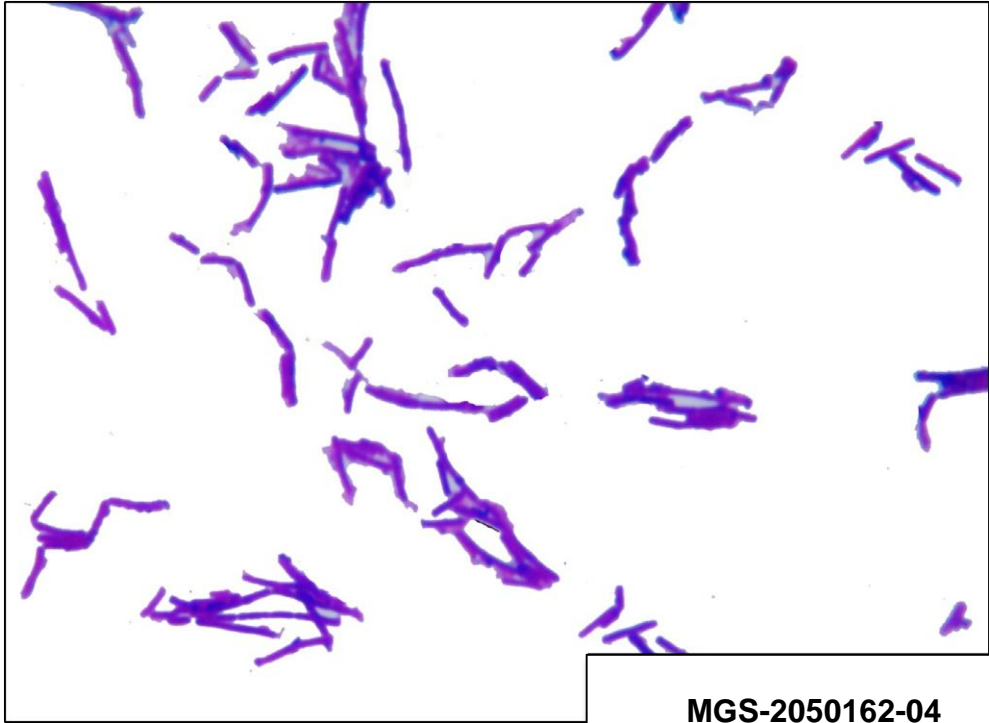
Anexo 1. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de la zona de muestreo.



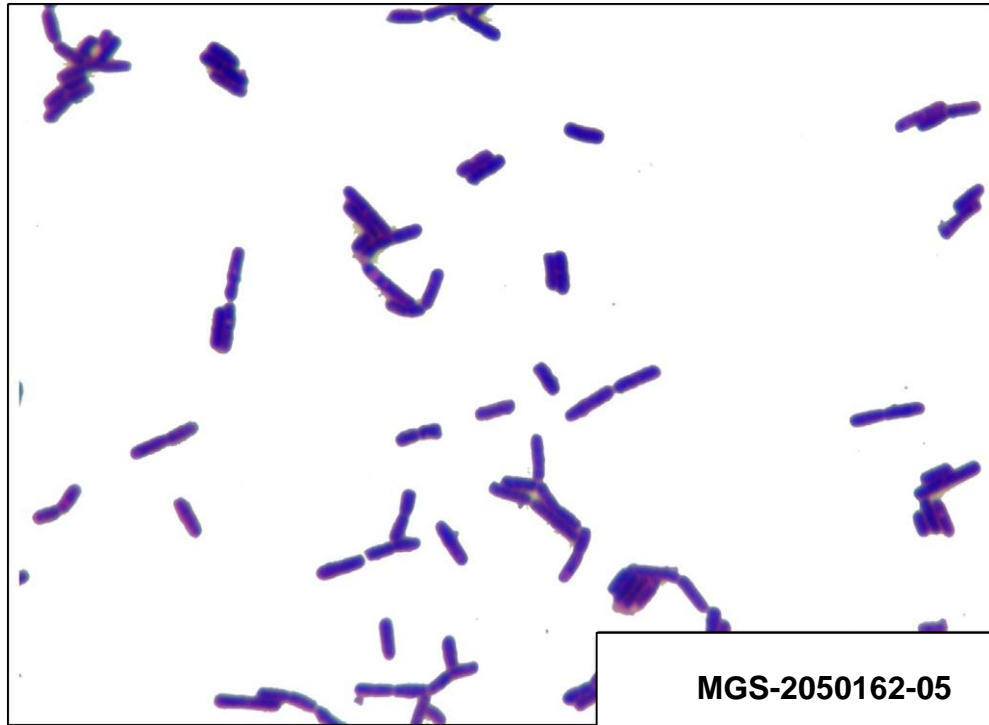
MGS-2050162-01



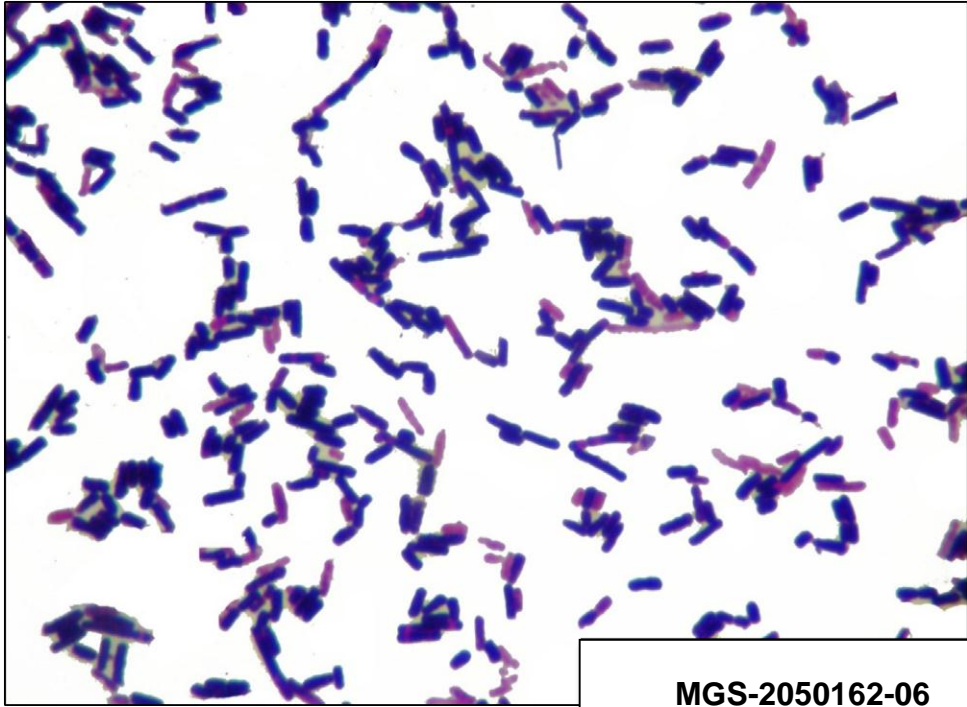
MGS-2050162-03



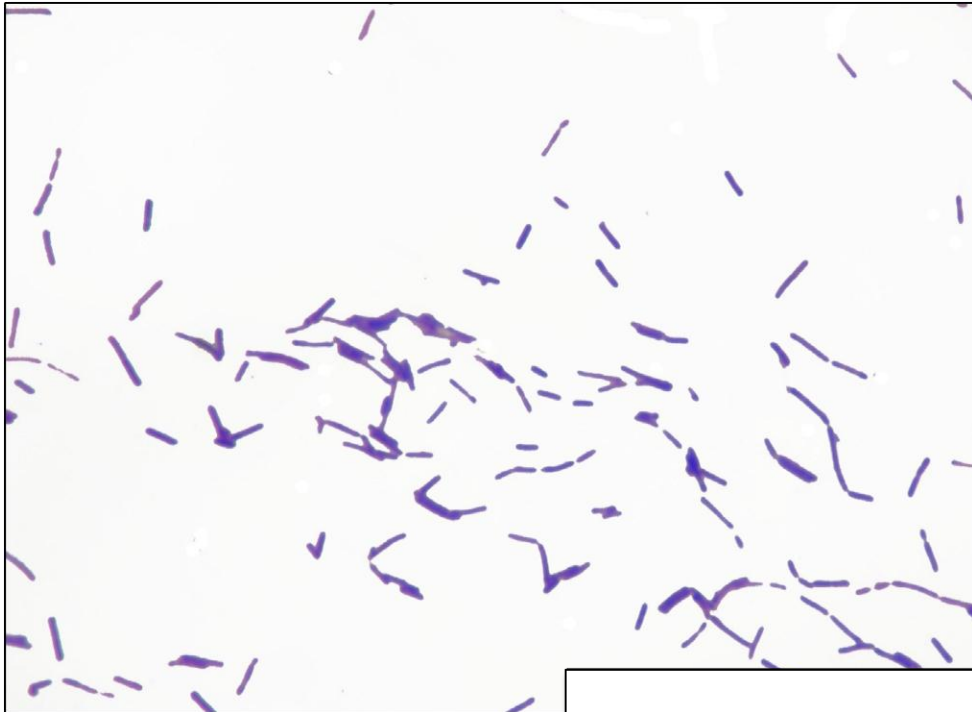
MGS-2050162-04



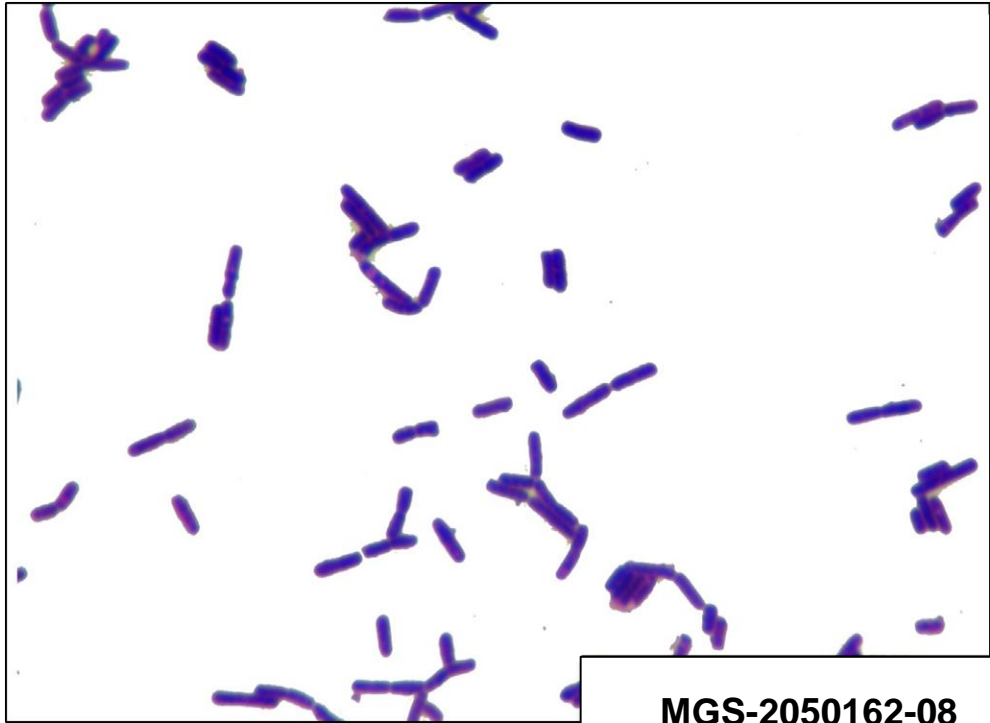
MGS-2050162-05



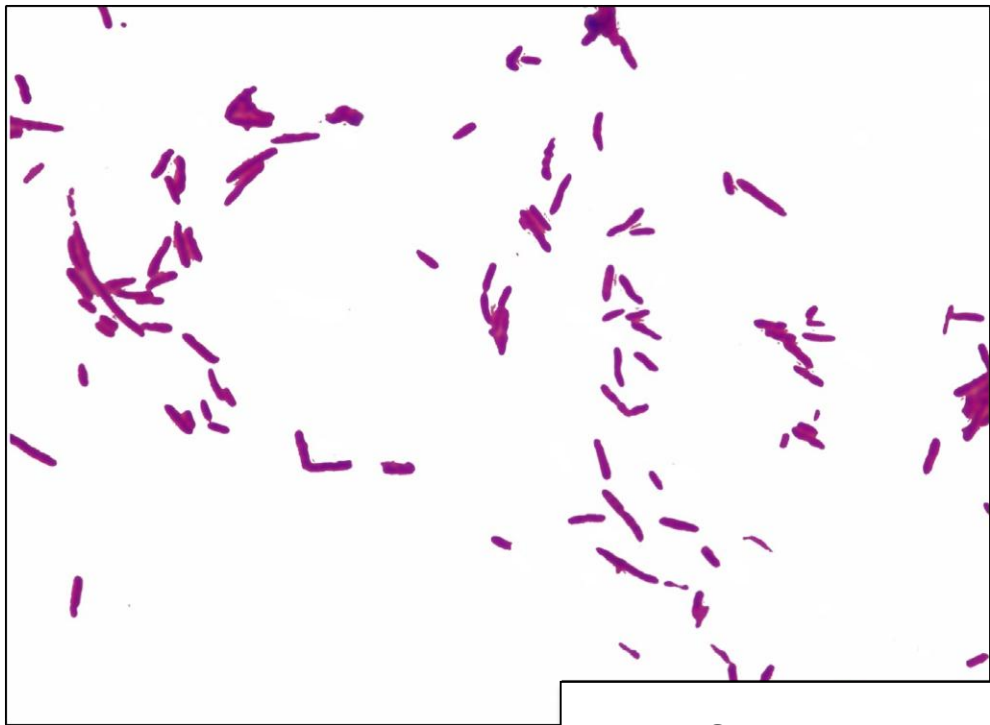
MGS-2050162-06



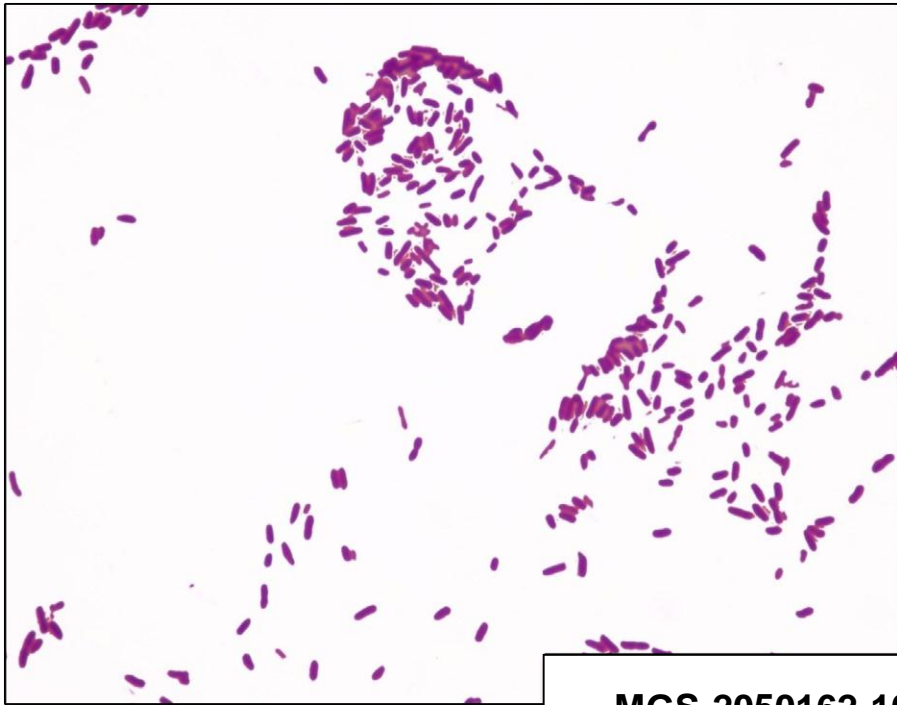
MGS-2050162-07



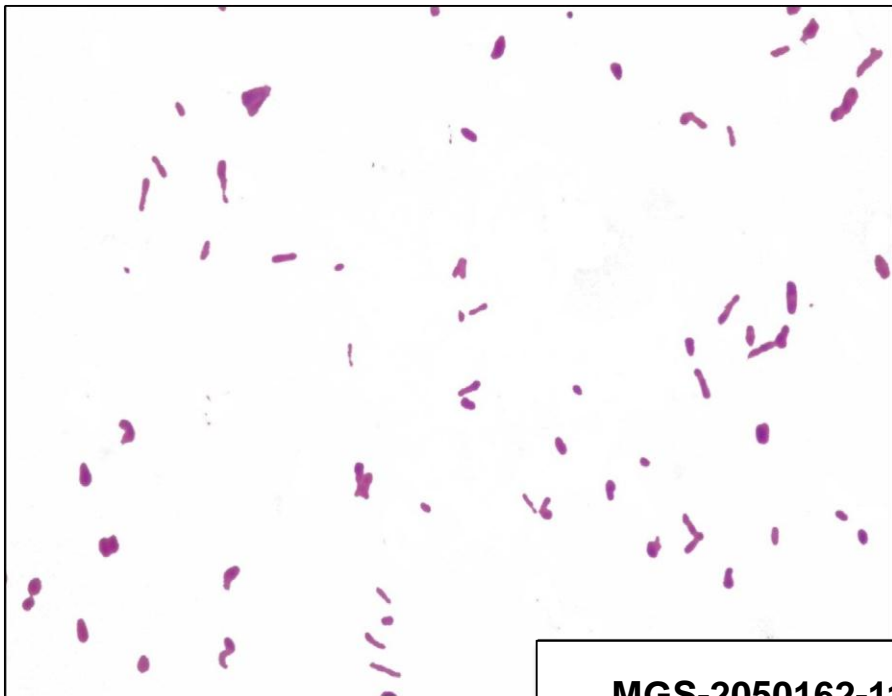
MGS-2050162-08



MGS-2050162-09



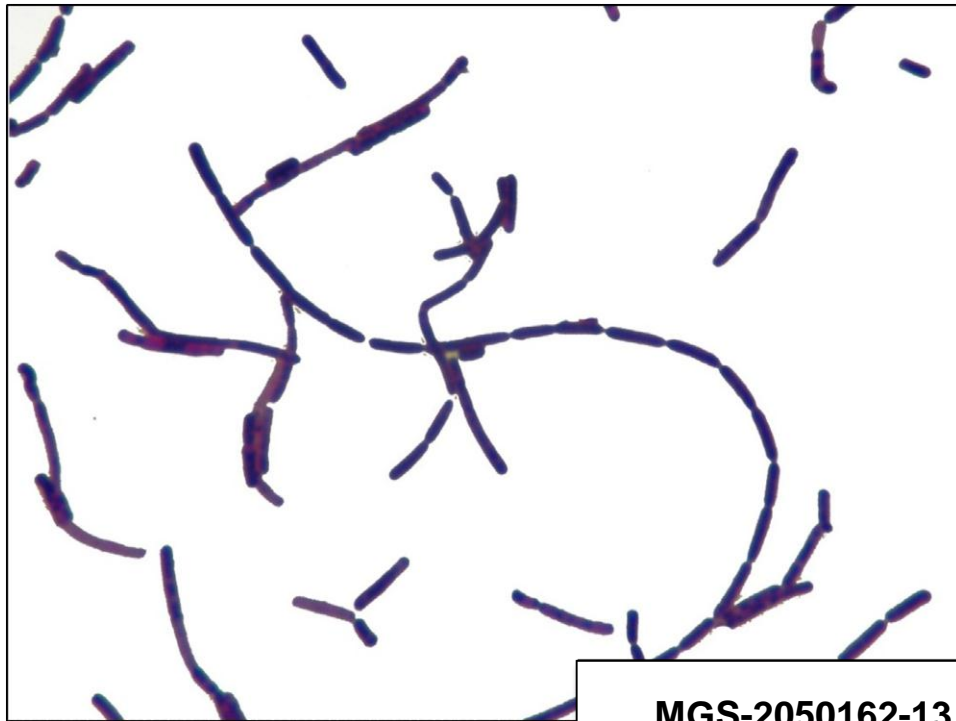
MGS-2050162-10



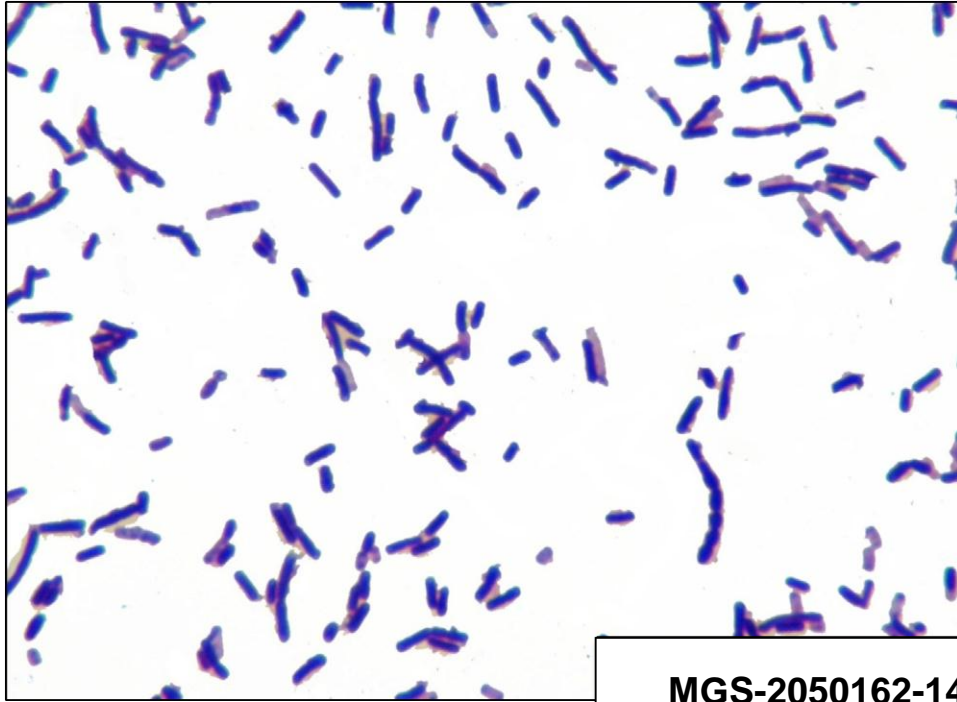
MGS-2050162-11



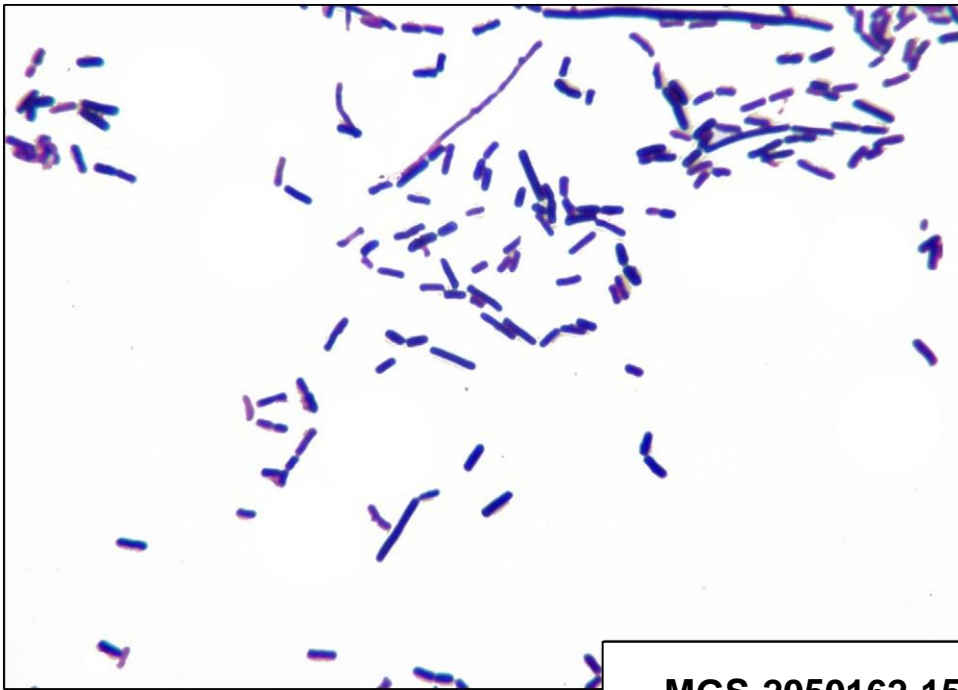
MGS-2050162-12



MGS-2050162-13



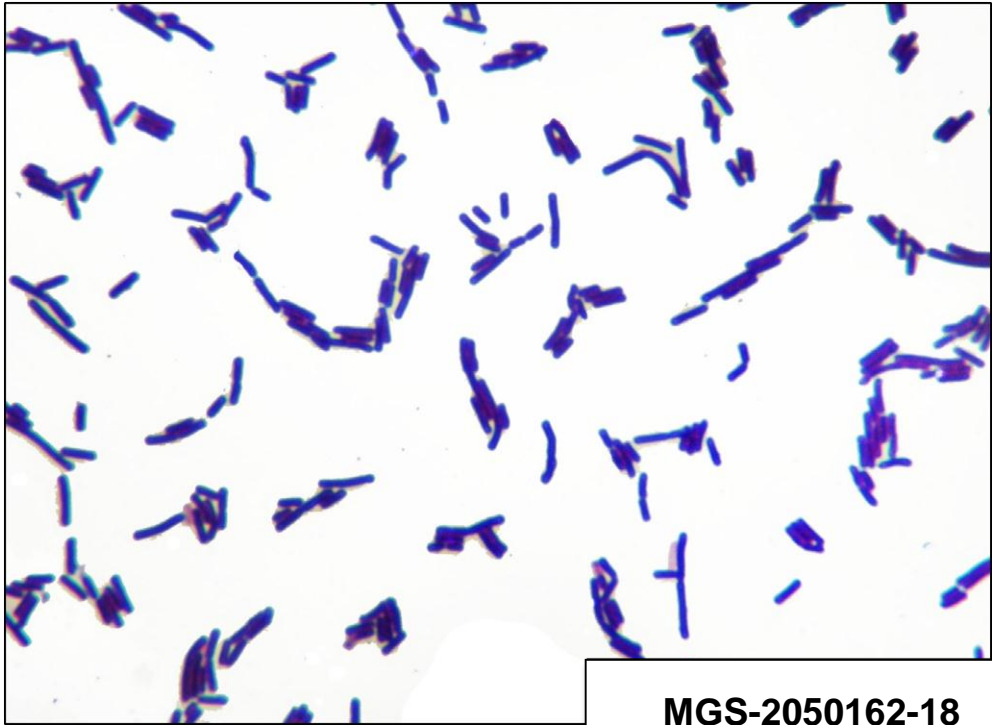
MGS-2050162-14



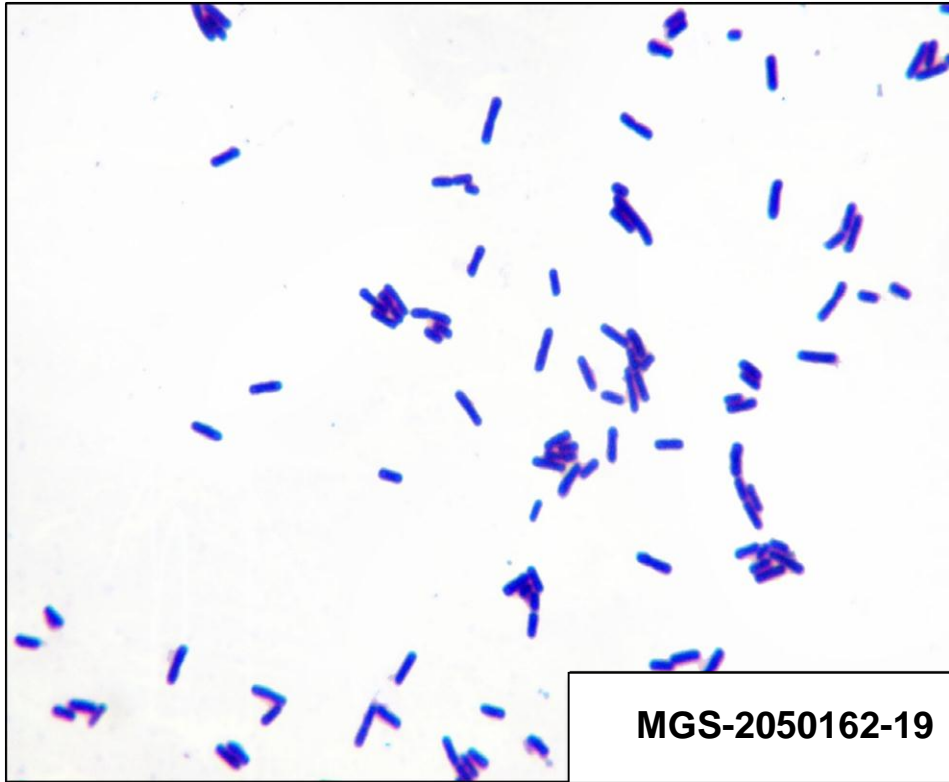
MGS-2050162-15



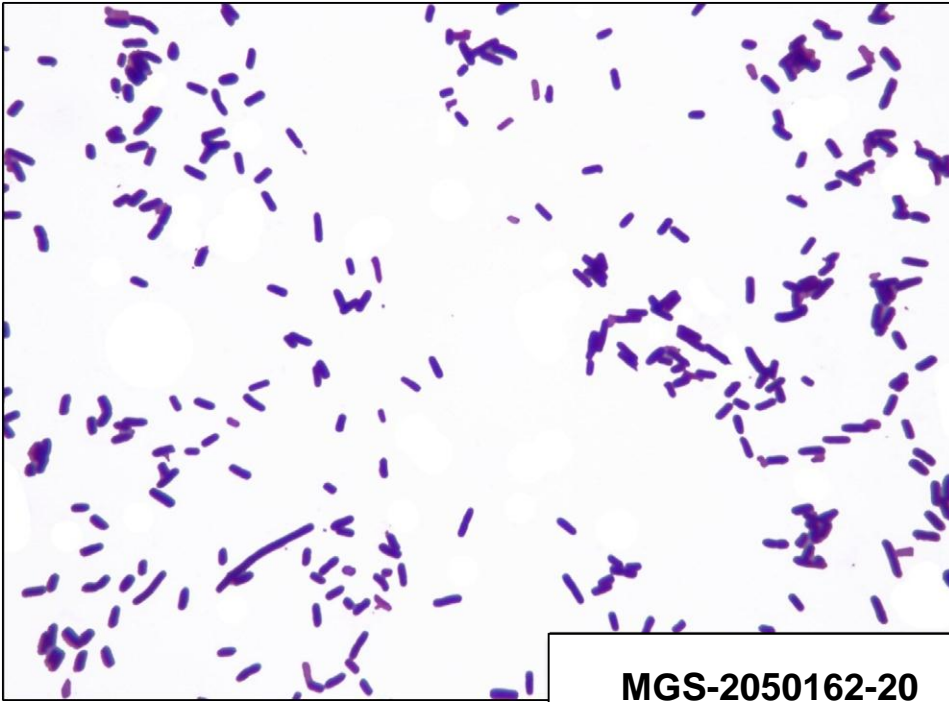
MGS-2050162-17



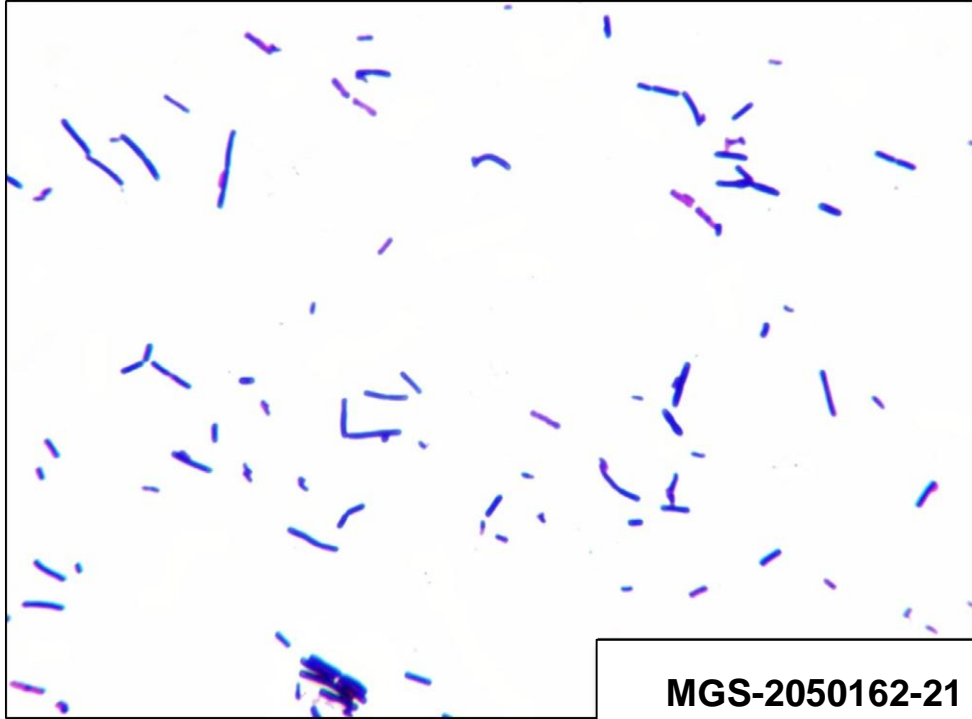
MGS-2050162-18



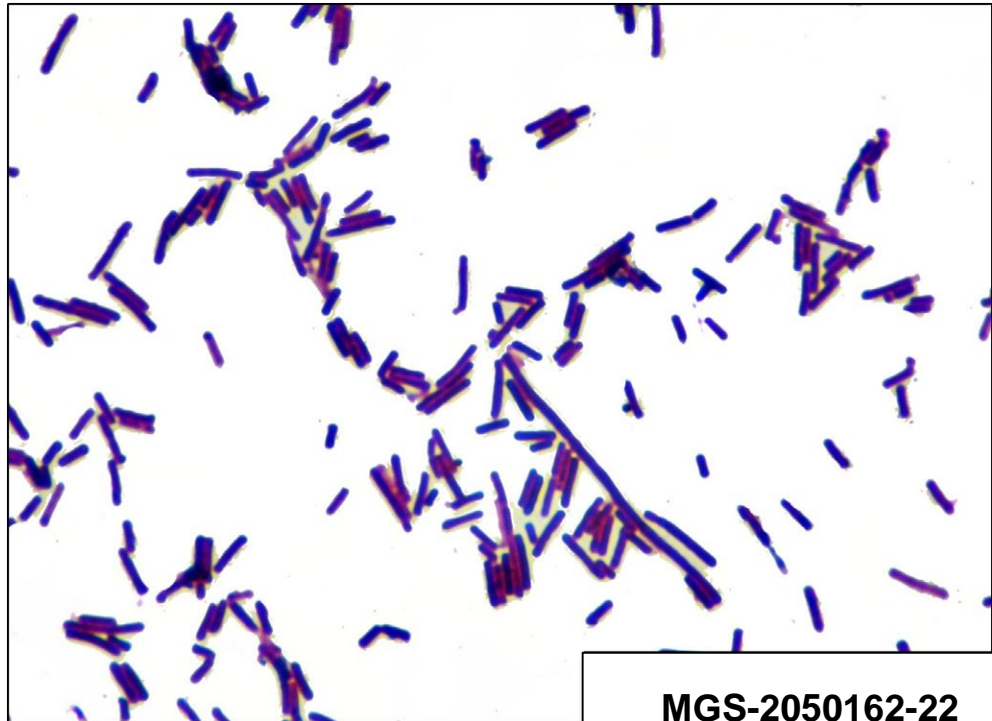
MGS-2050162-19



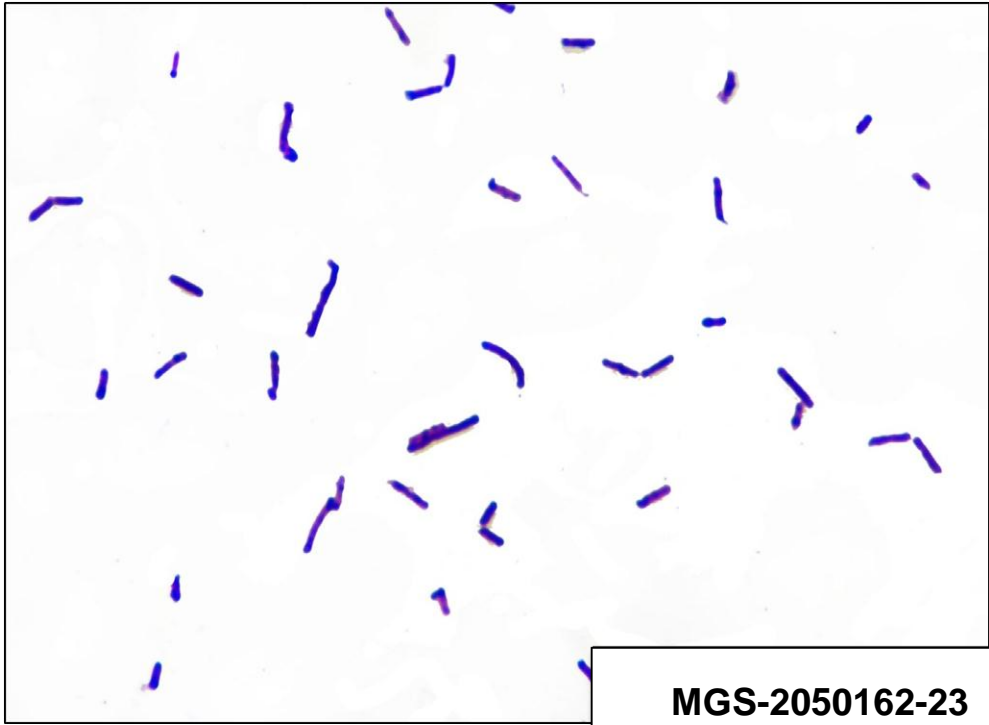
MGS-2050162-20



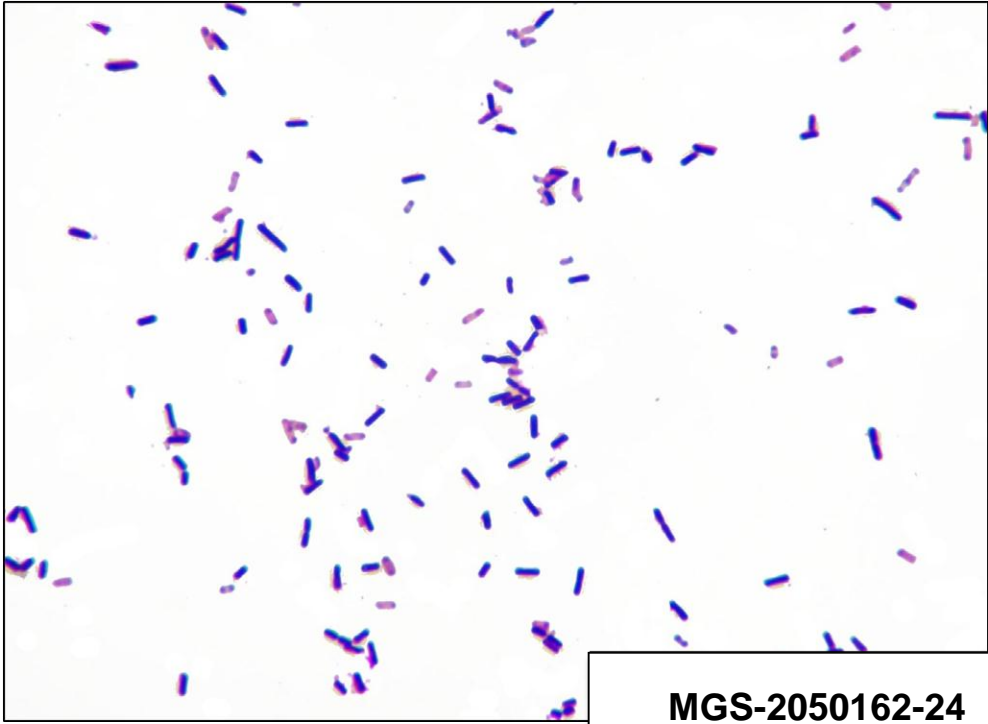
MGS-2050162-21



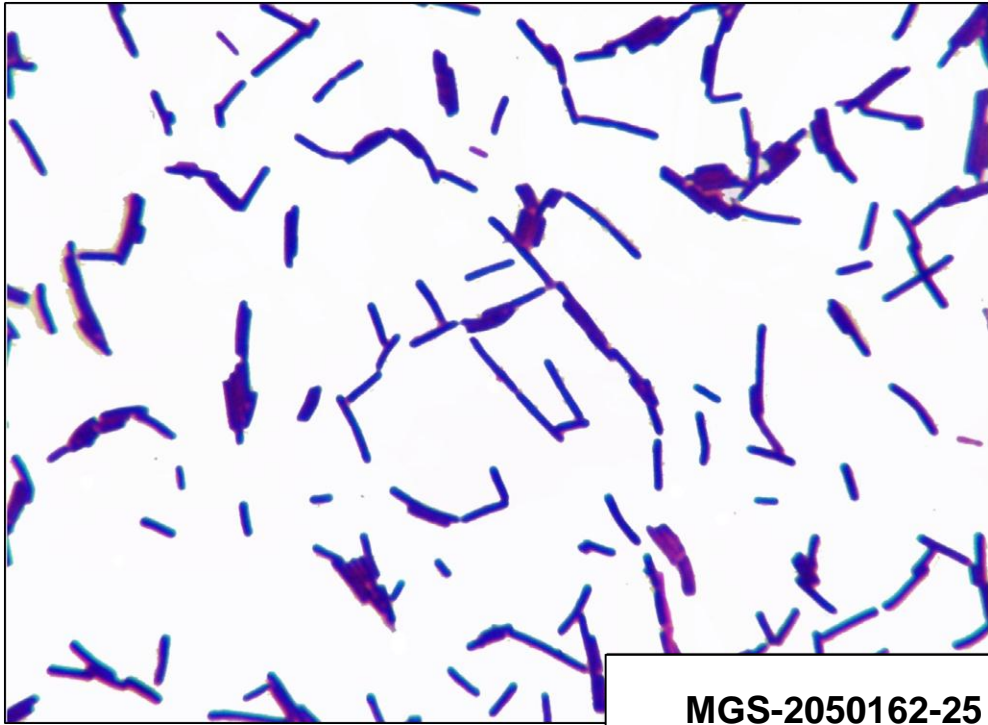
MGS-2050162-22



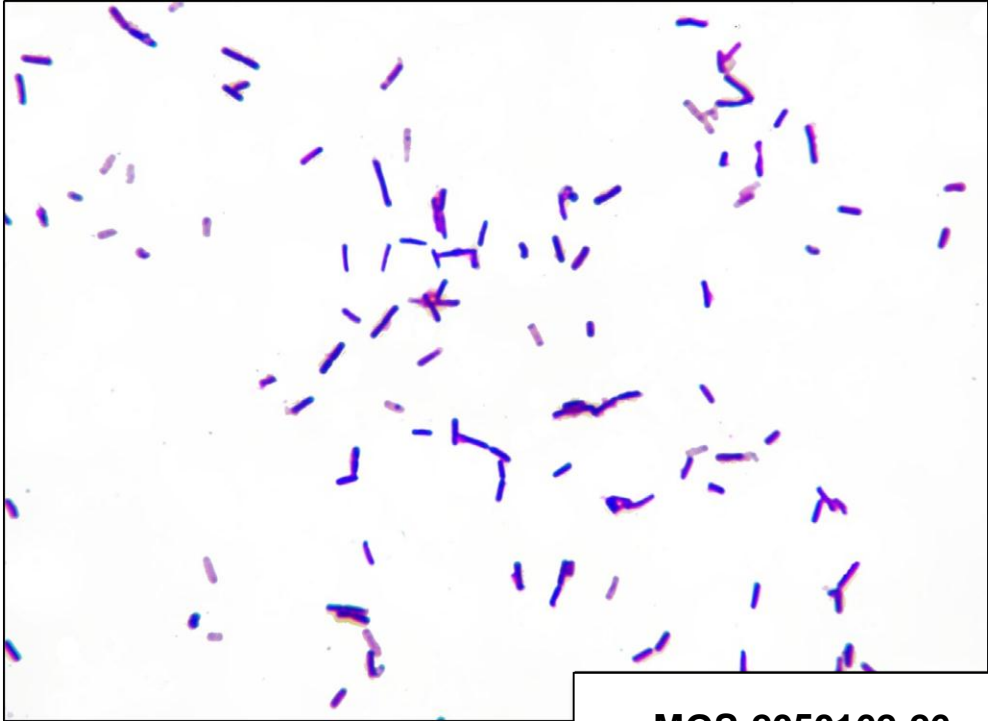
MGS-2050162-23



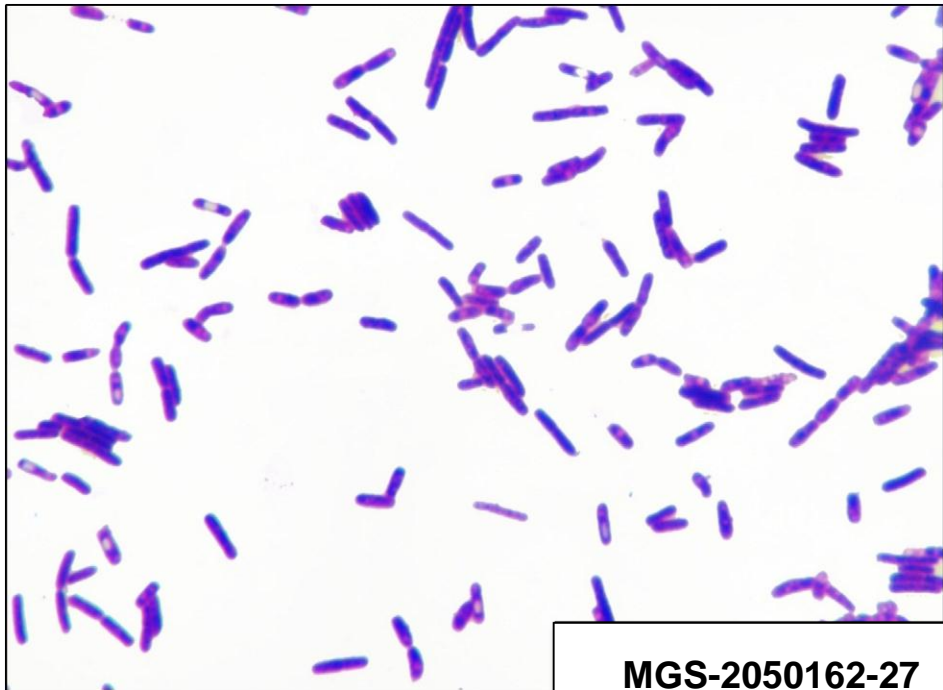
MGS-2050162-24



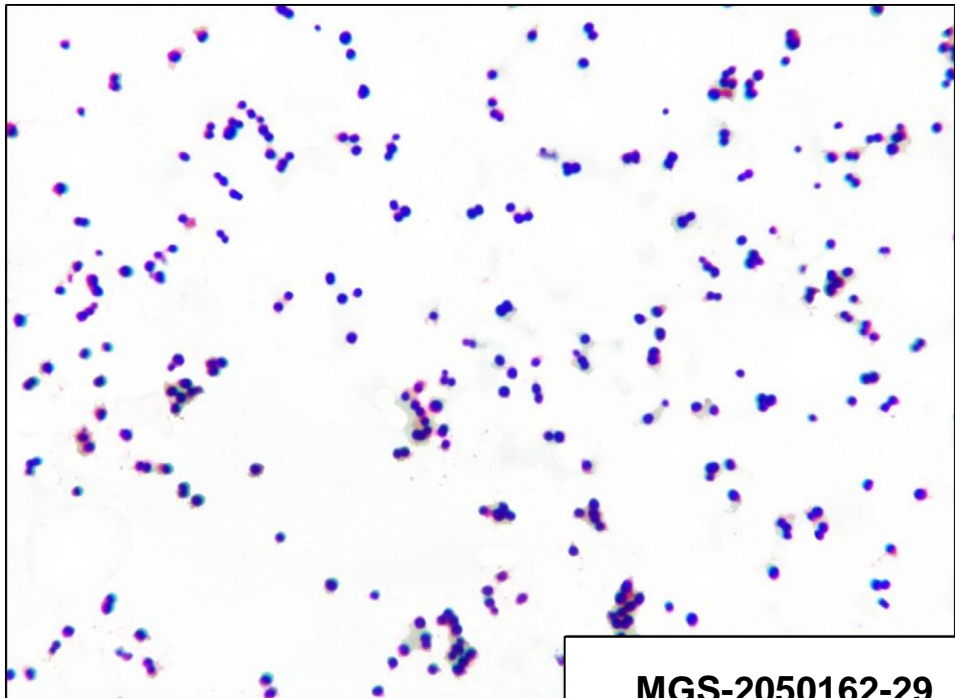
MGS-2050162-25



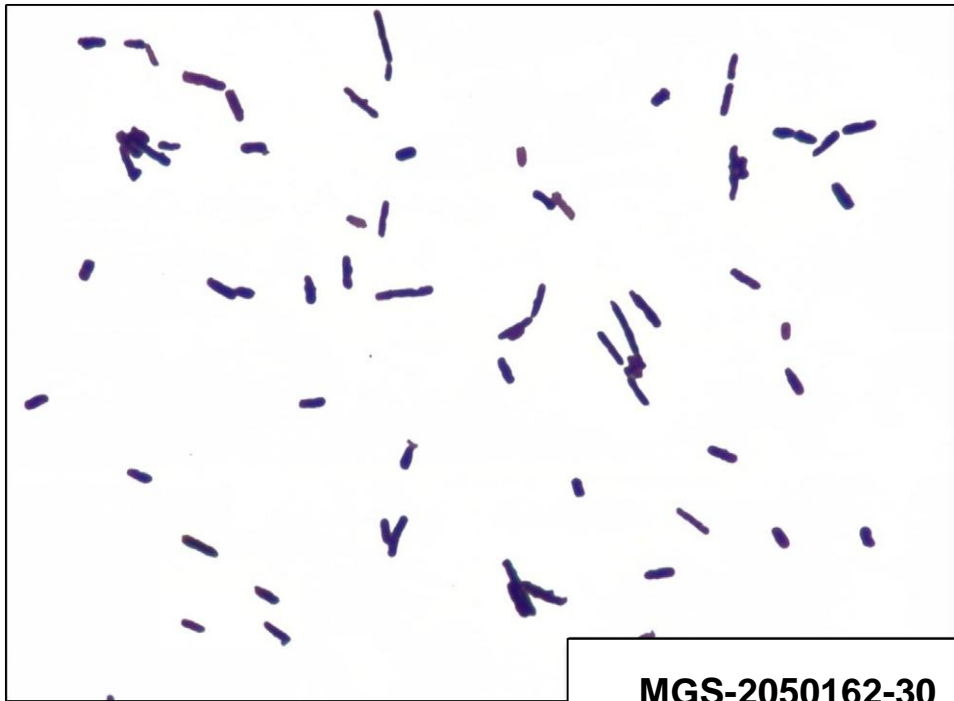
MGS-2050162-26



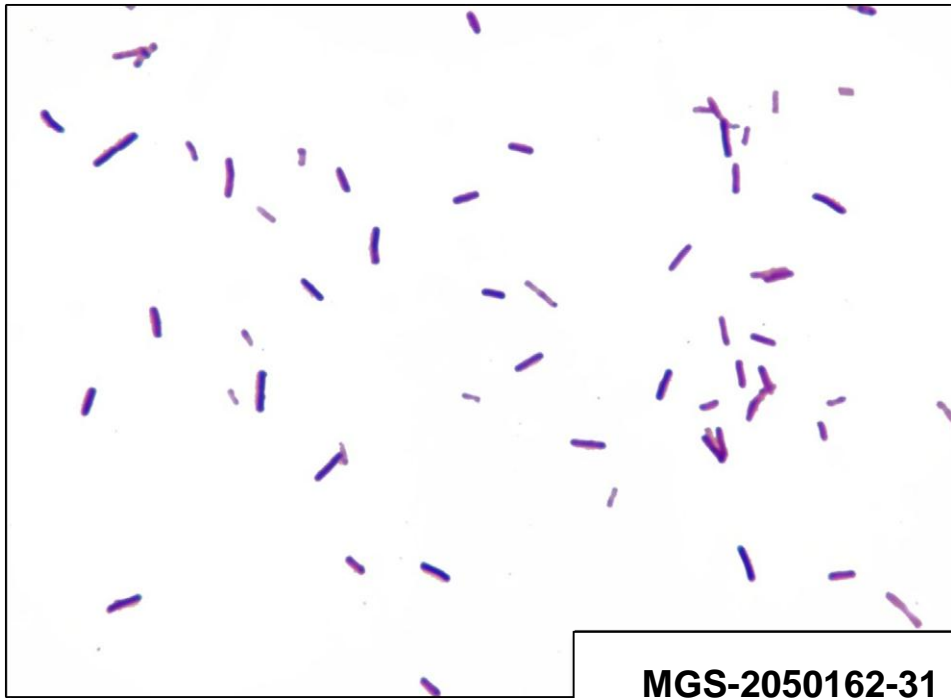
MGS-2050162-27



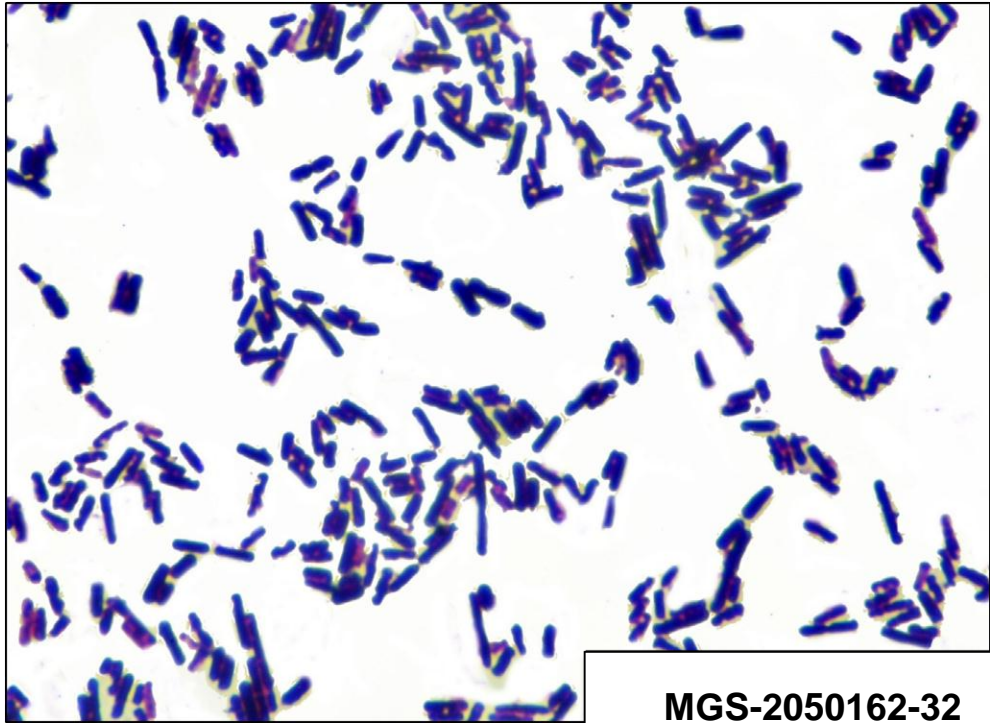
MGS-2050162-29



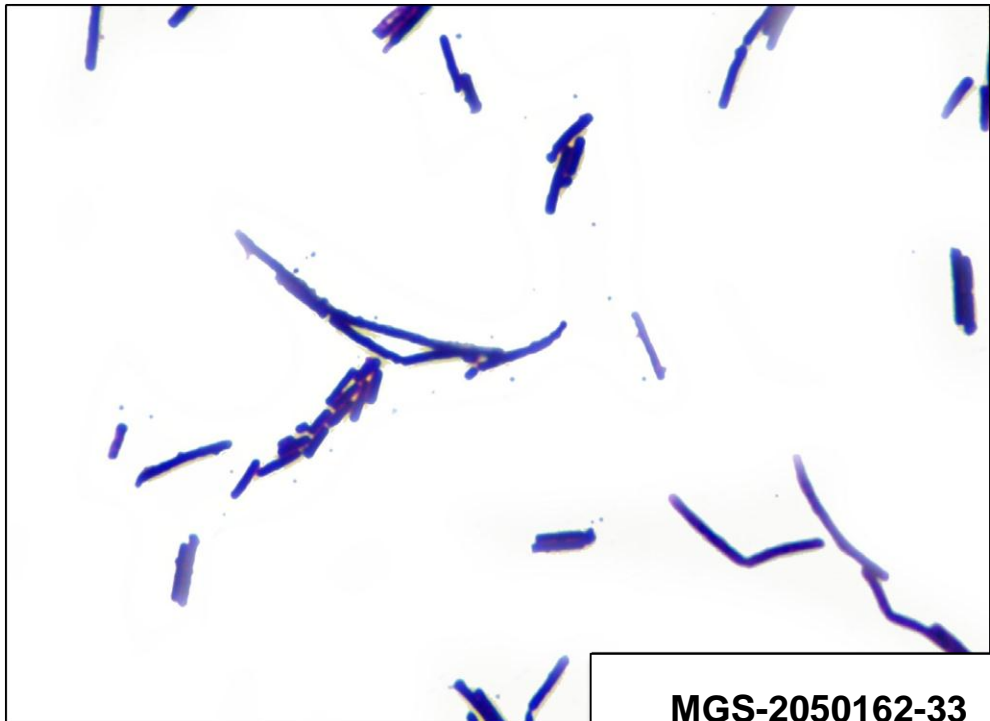
MGS-2050162-30



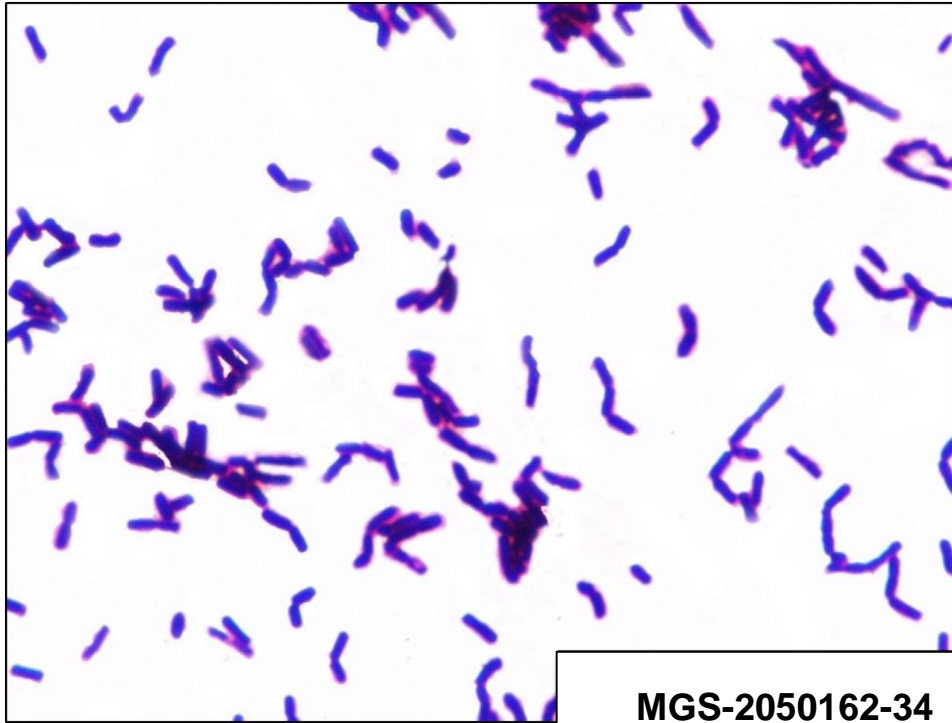
MGS-2050162-31



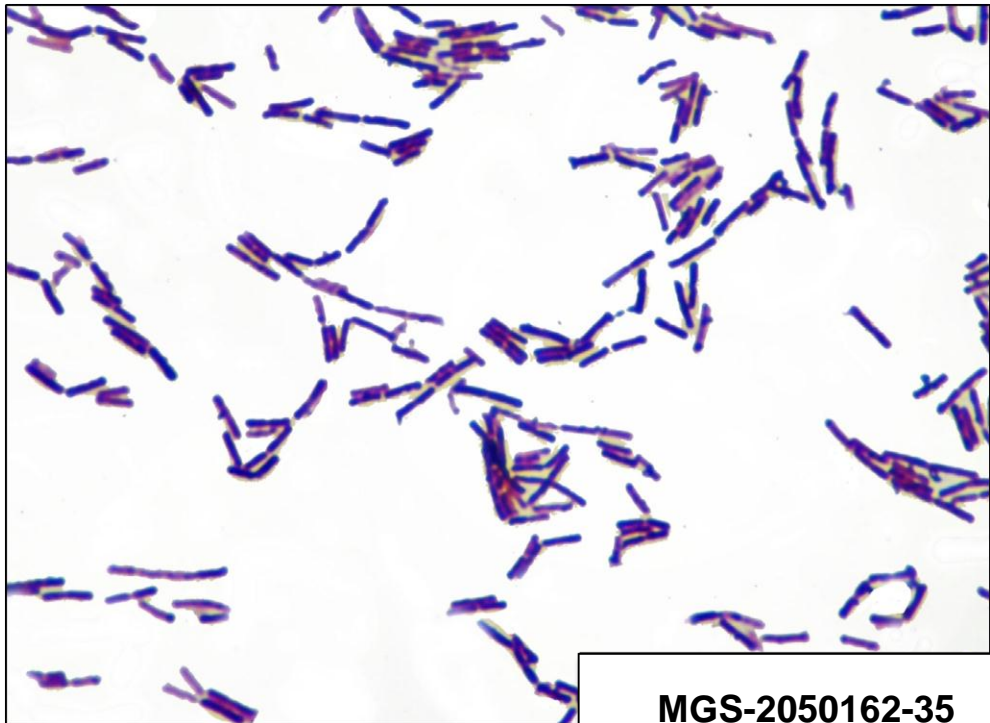
MGS-2050162-32



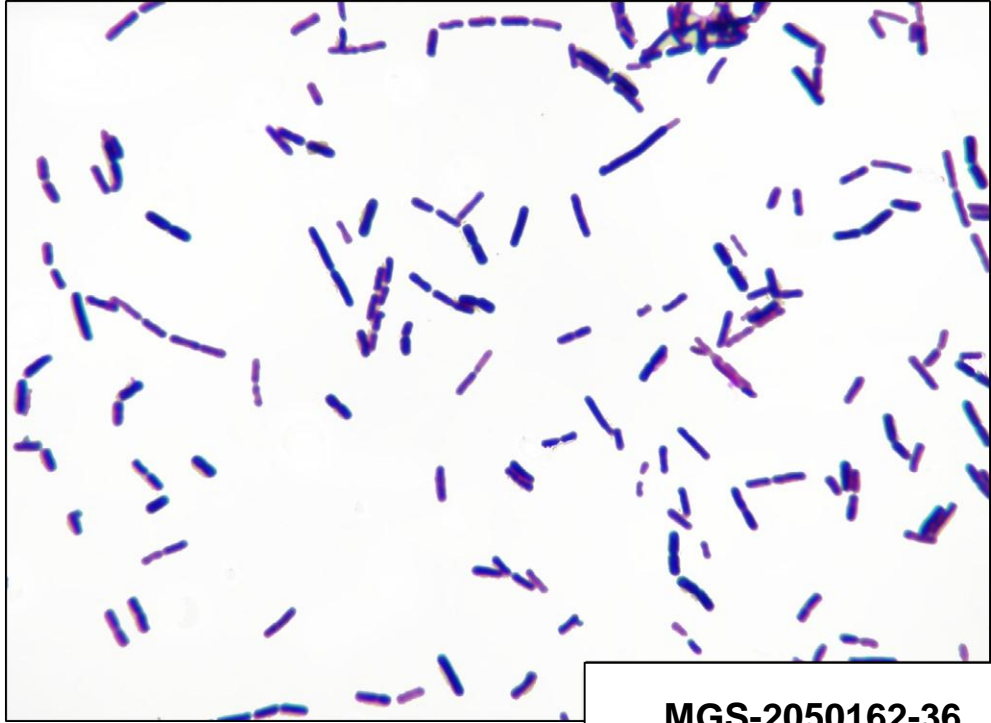
MGS-2050162-33



MGS-2050162-34



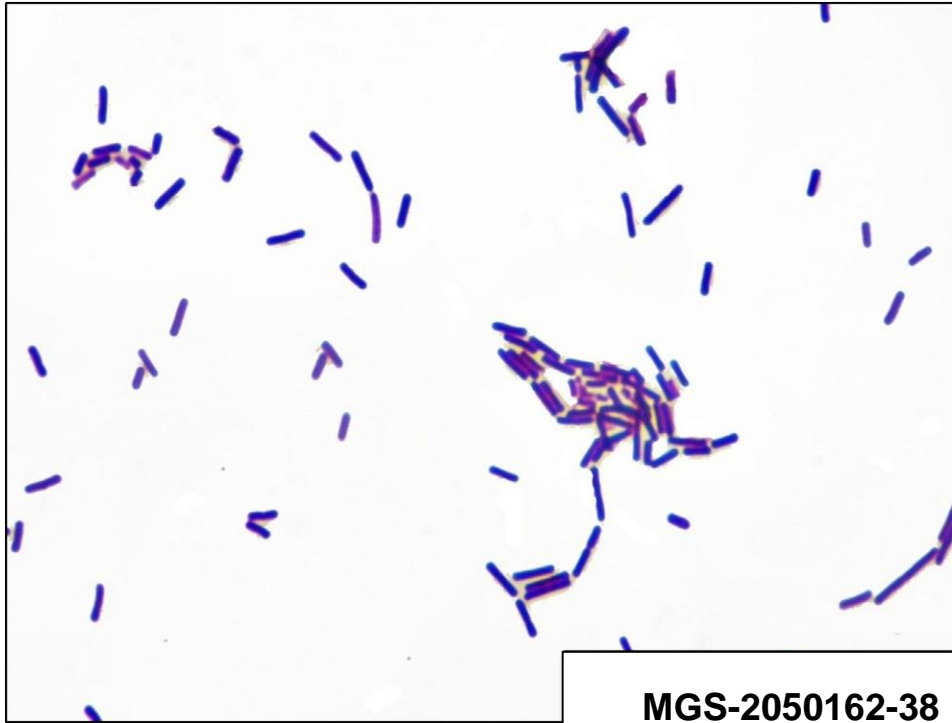
MGS-2050162-35



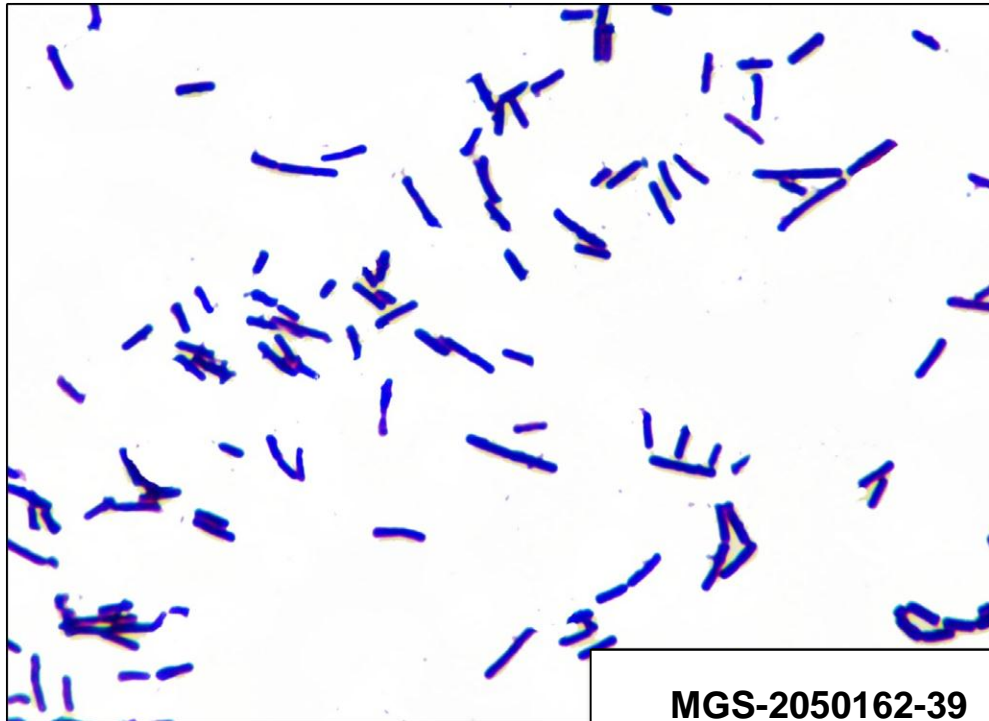
MGS-2050162-36



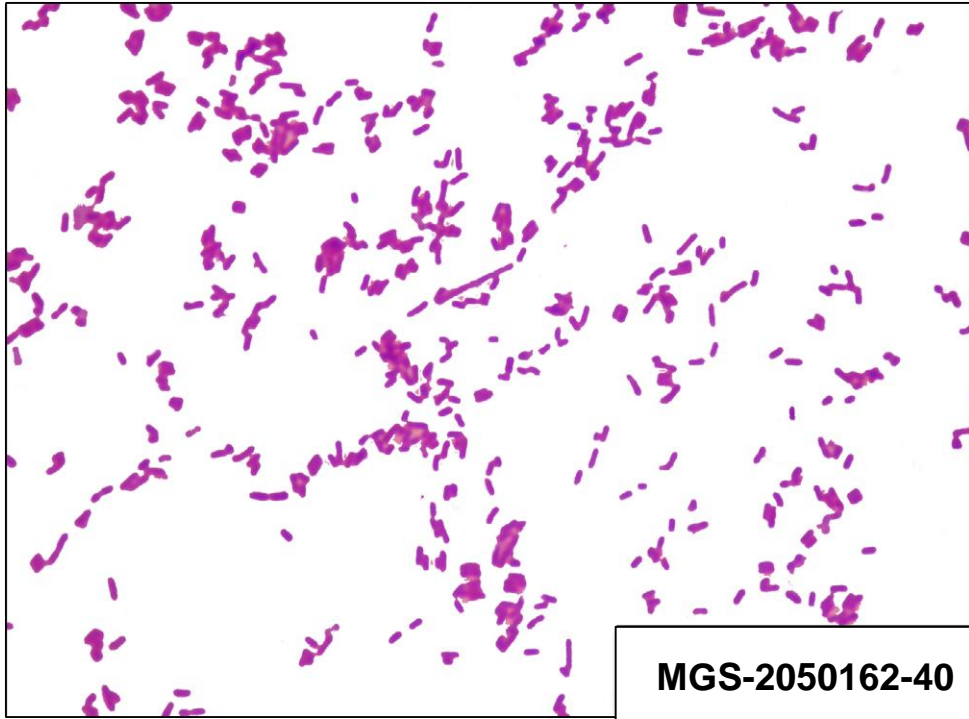
MGS-2050162-37



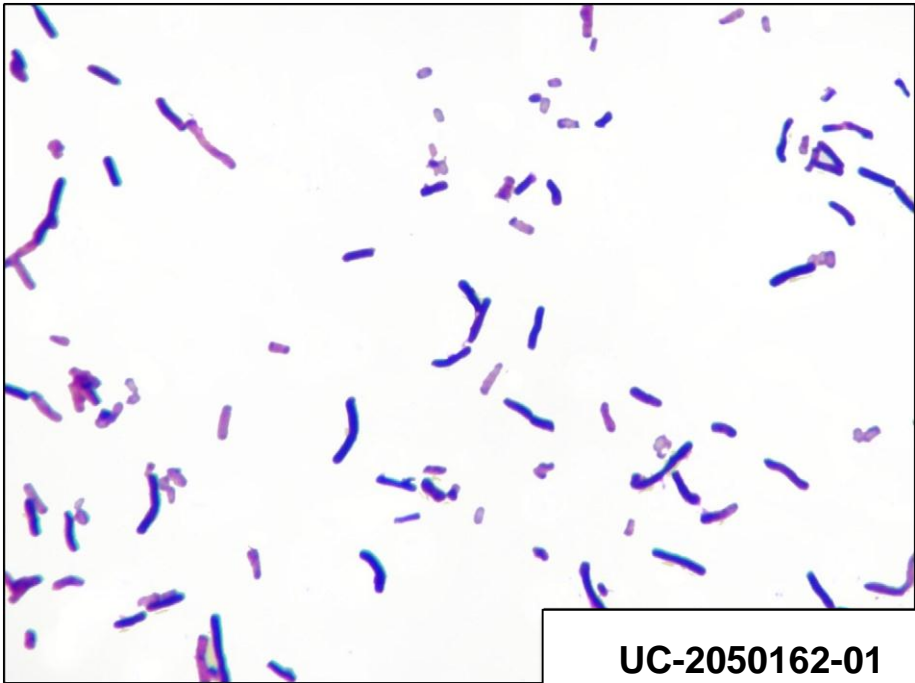
MGS-2050162-38



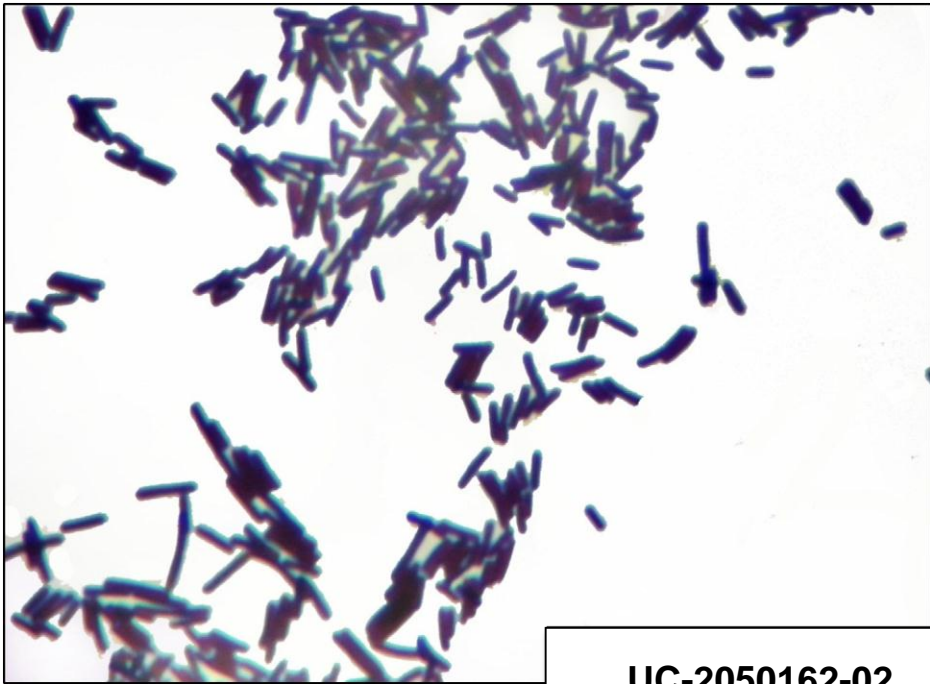
MGS-2050162-39



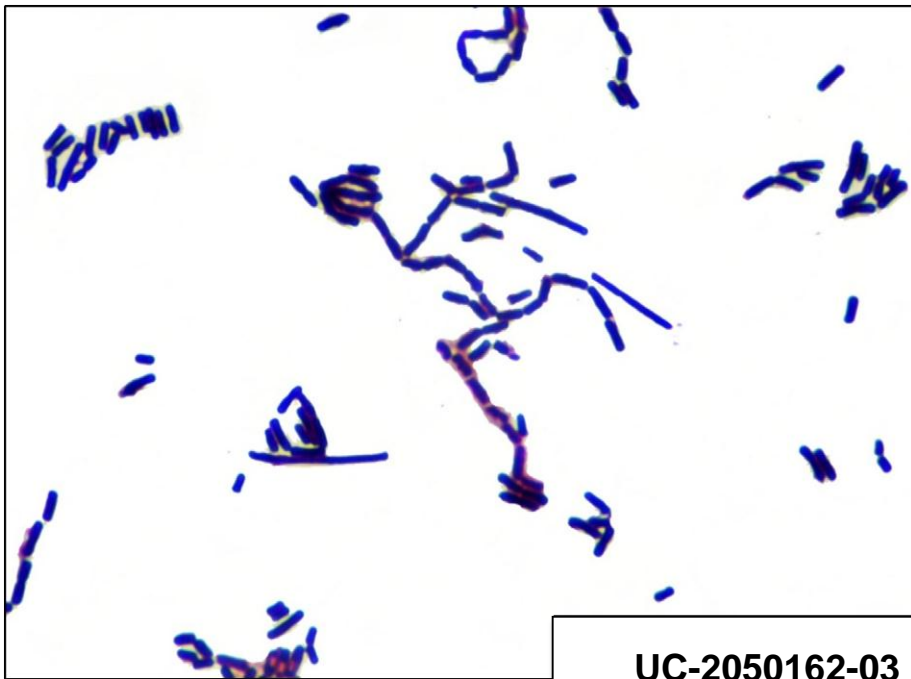
MGS-2050162-40



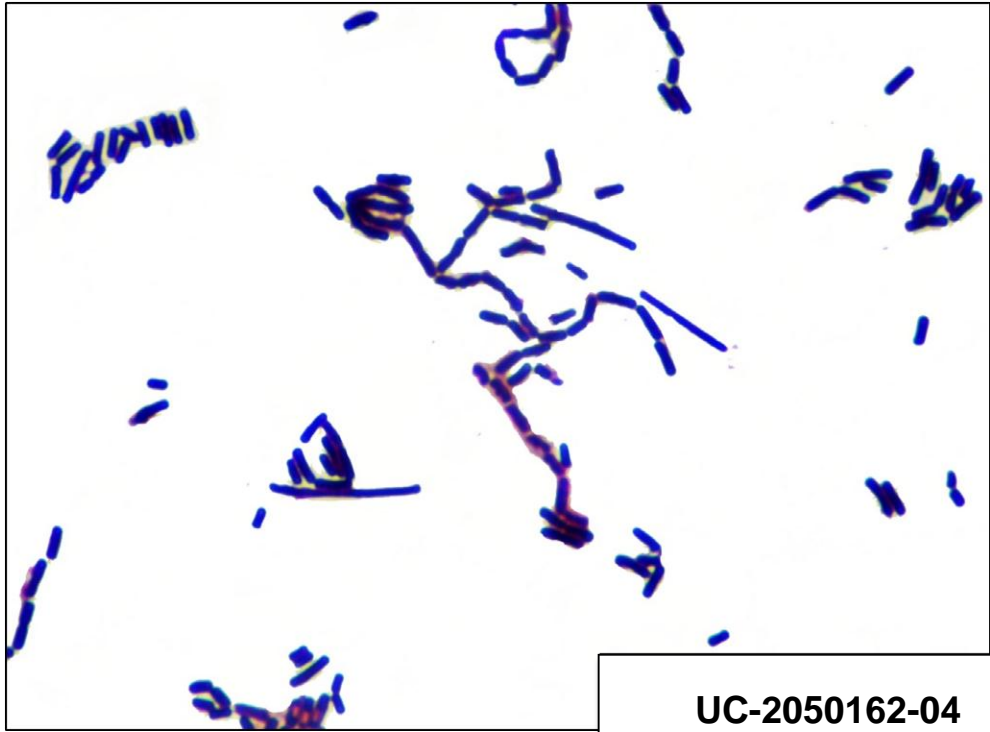
UC-2050162-01



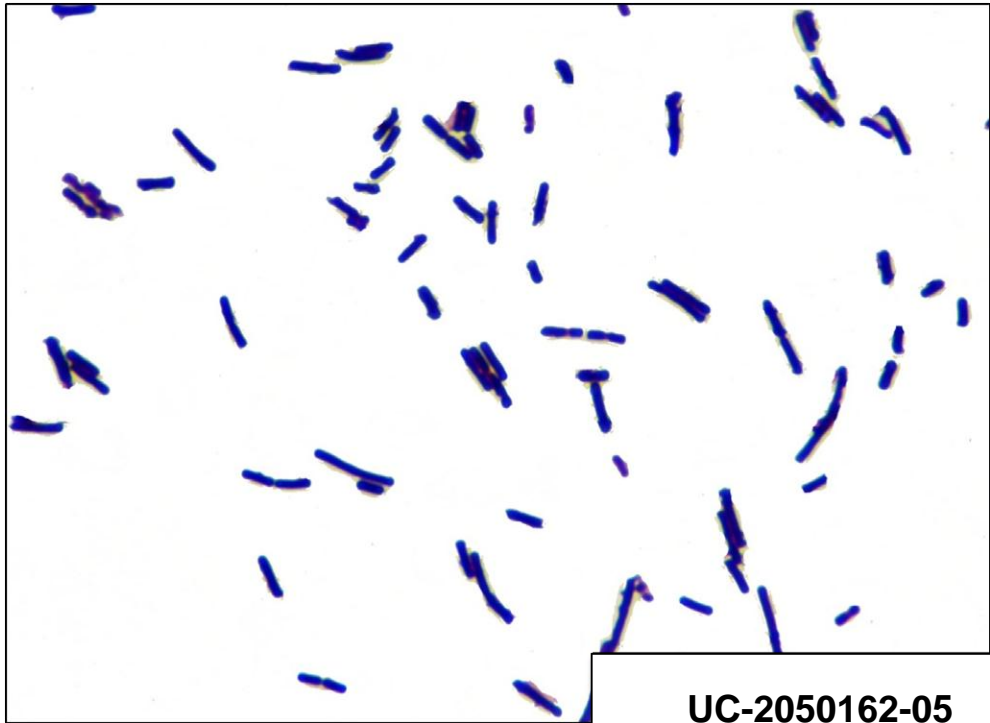
UC-2050162-02



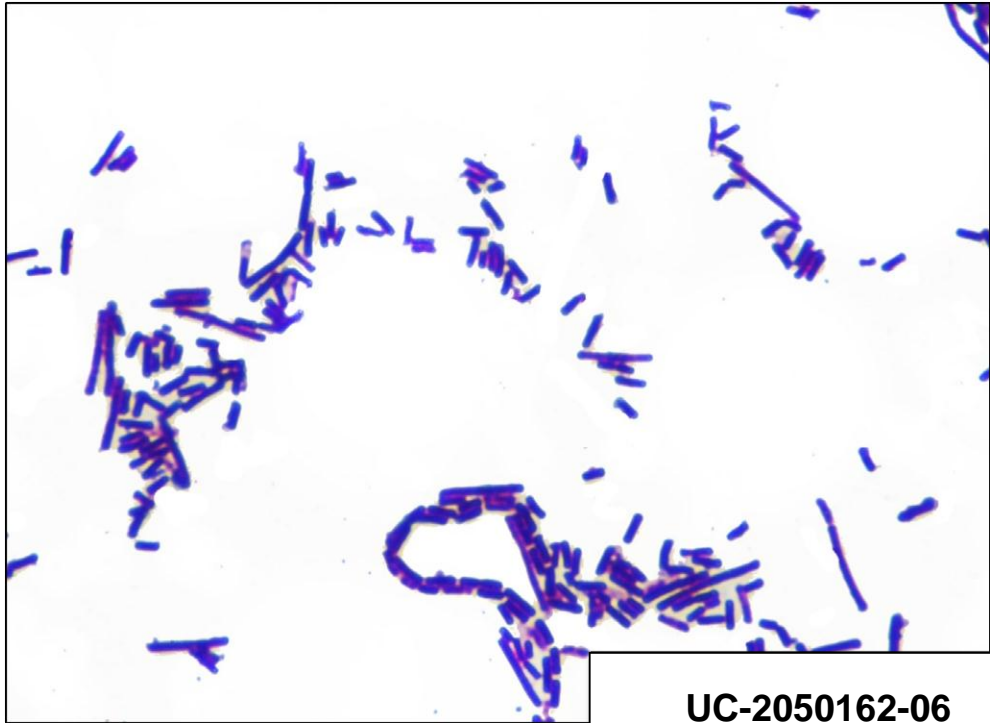
UC-2050162-03



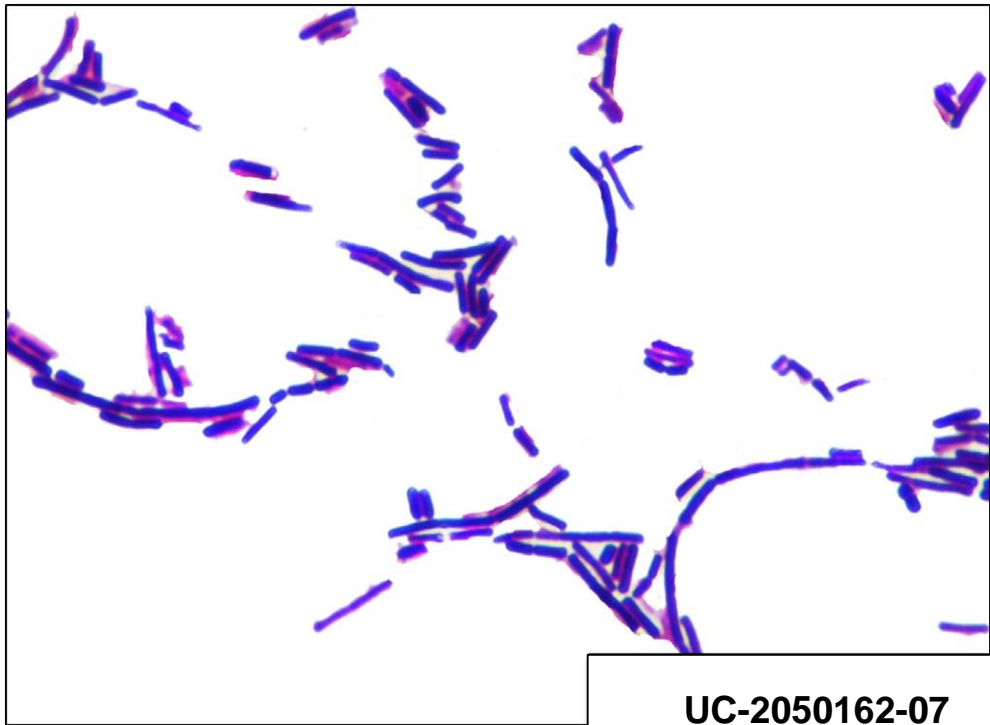
UC-2050162-04



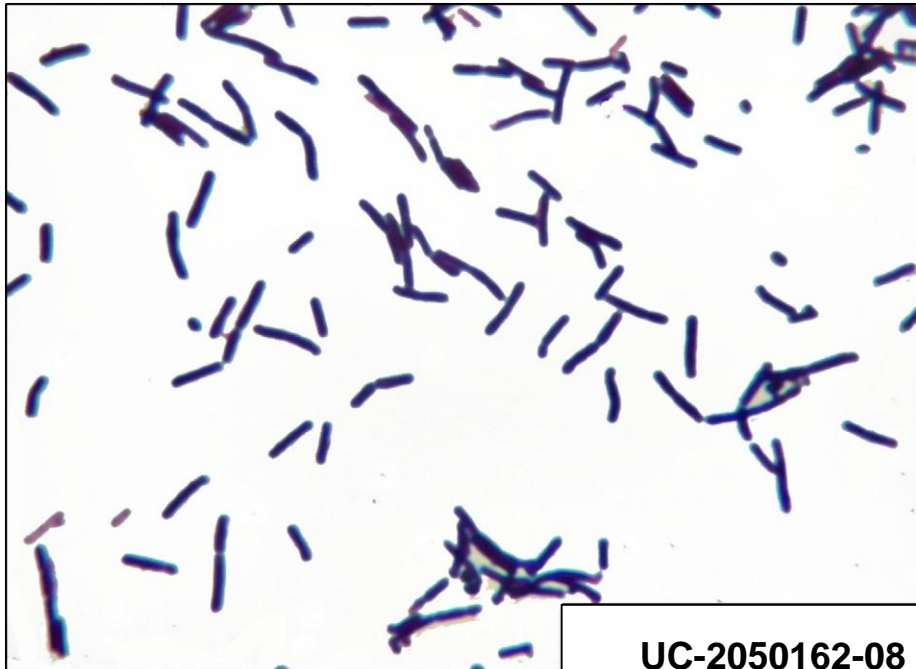
UC-2050162-05



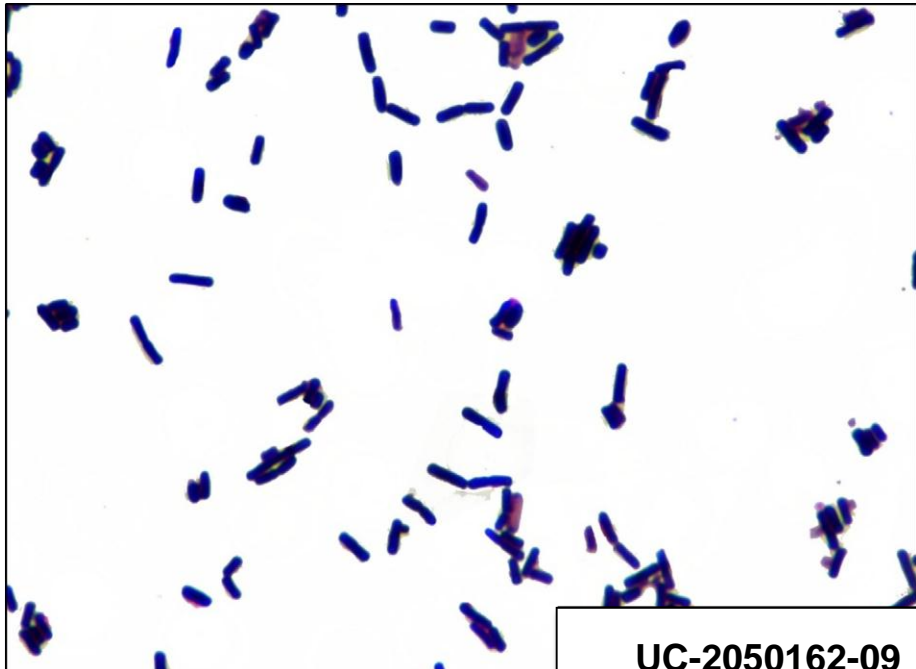
UC-2050162-06



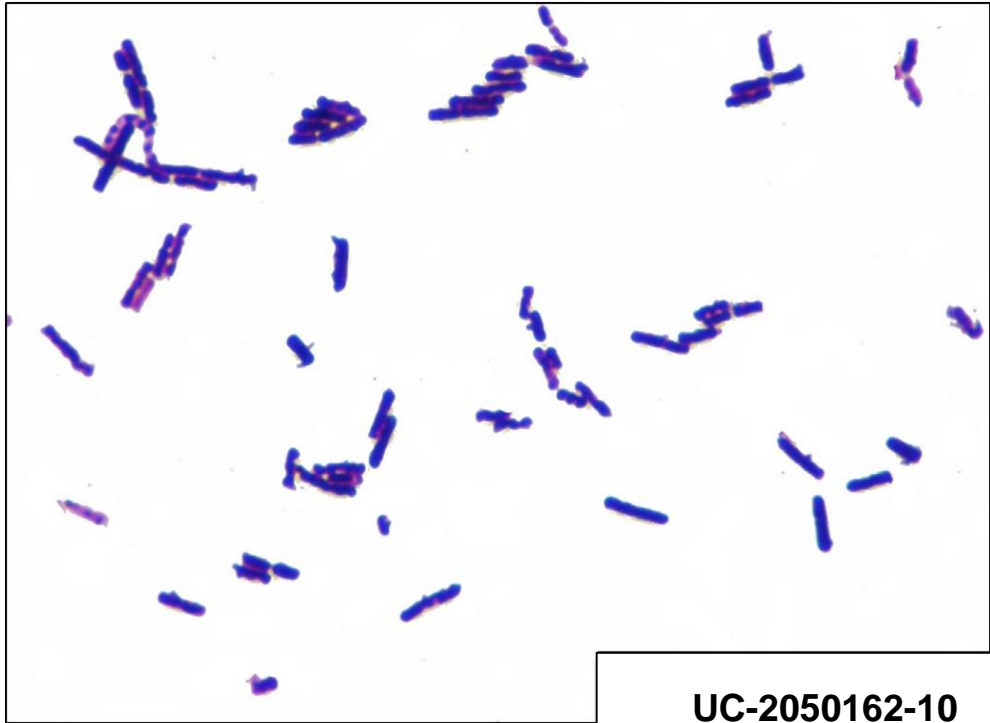
UC-2050162-07



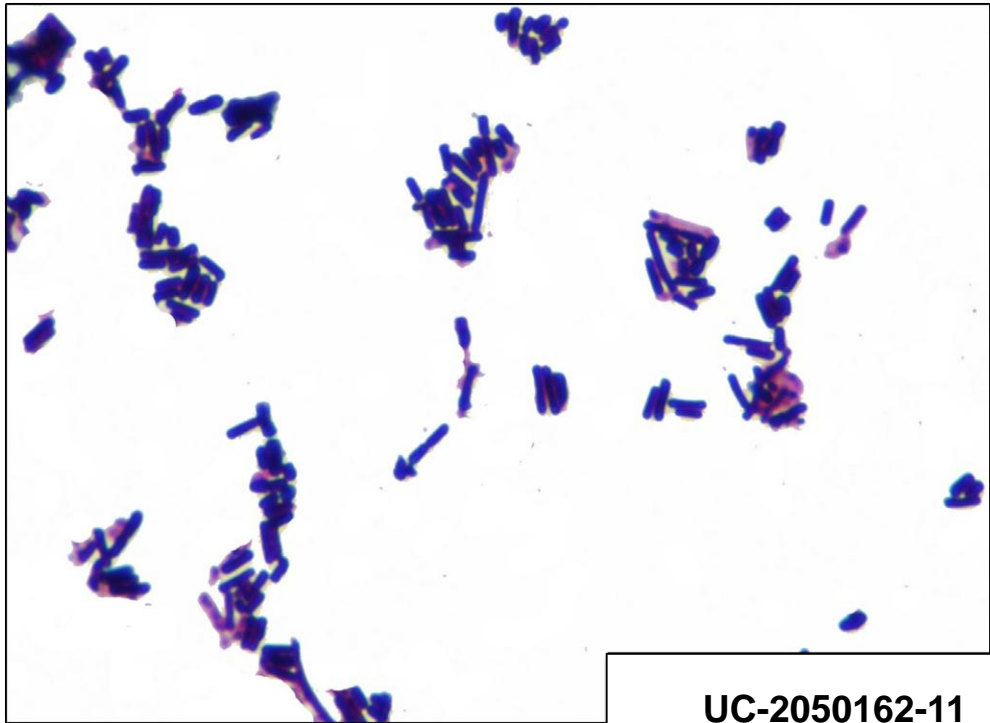
UC-2050162-08



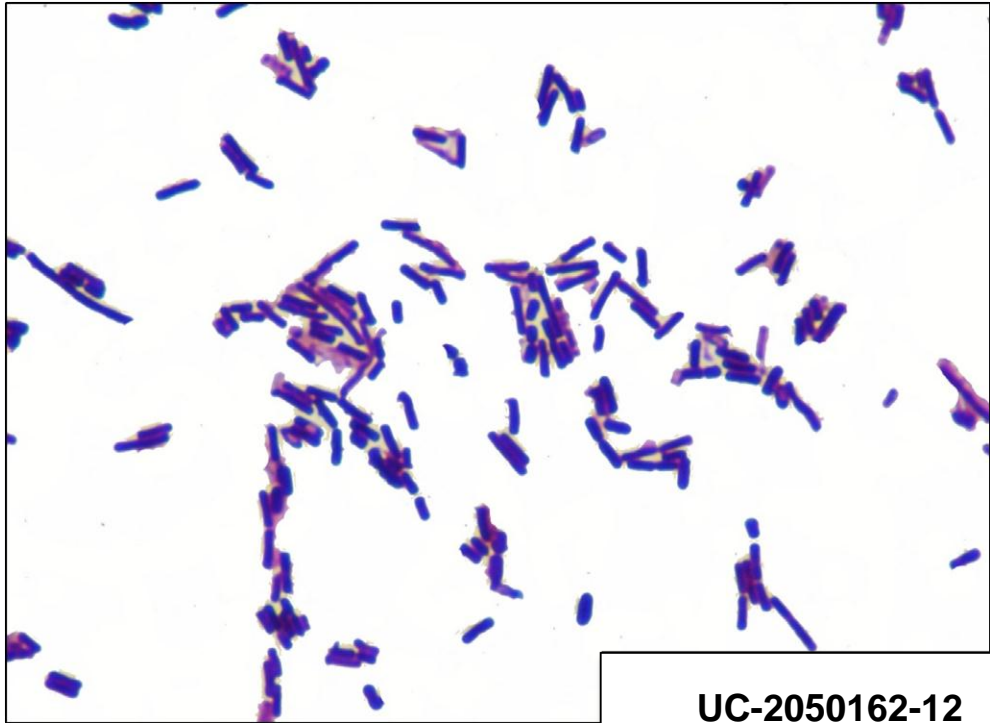
UC-2050162-09



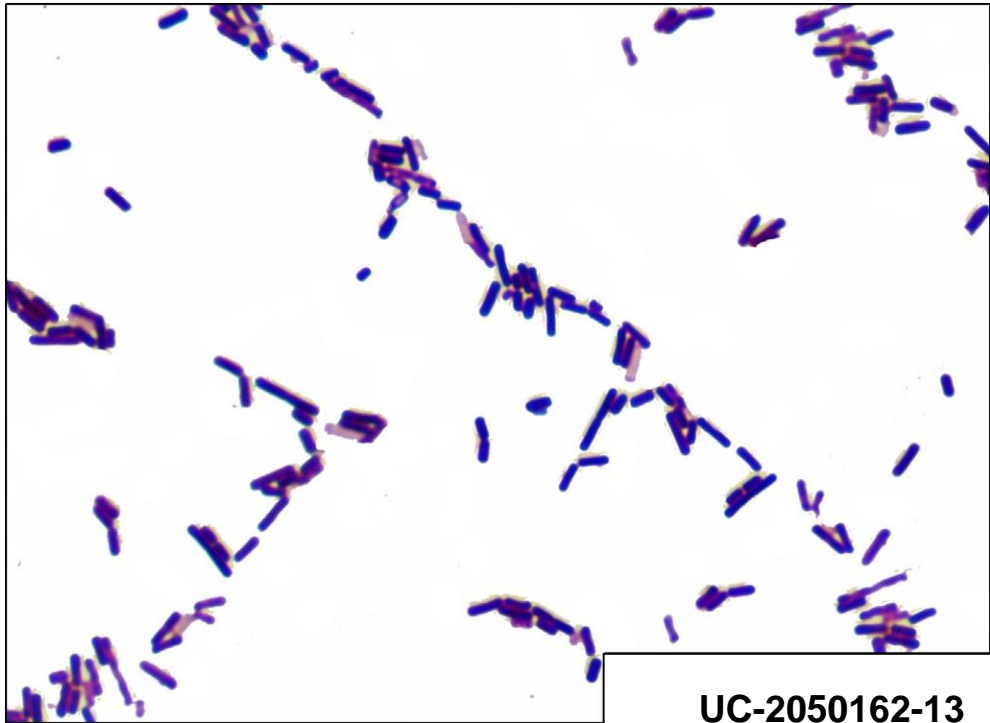
UC-2050162-10



UC-2050162-11



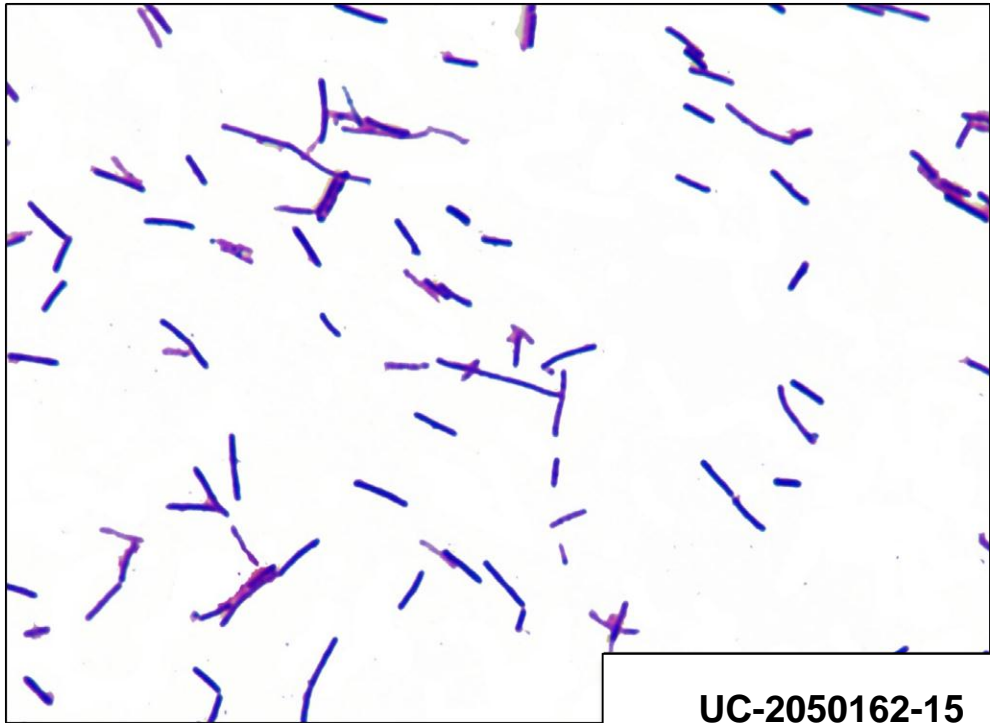
UC-2050162-12



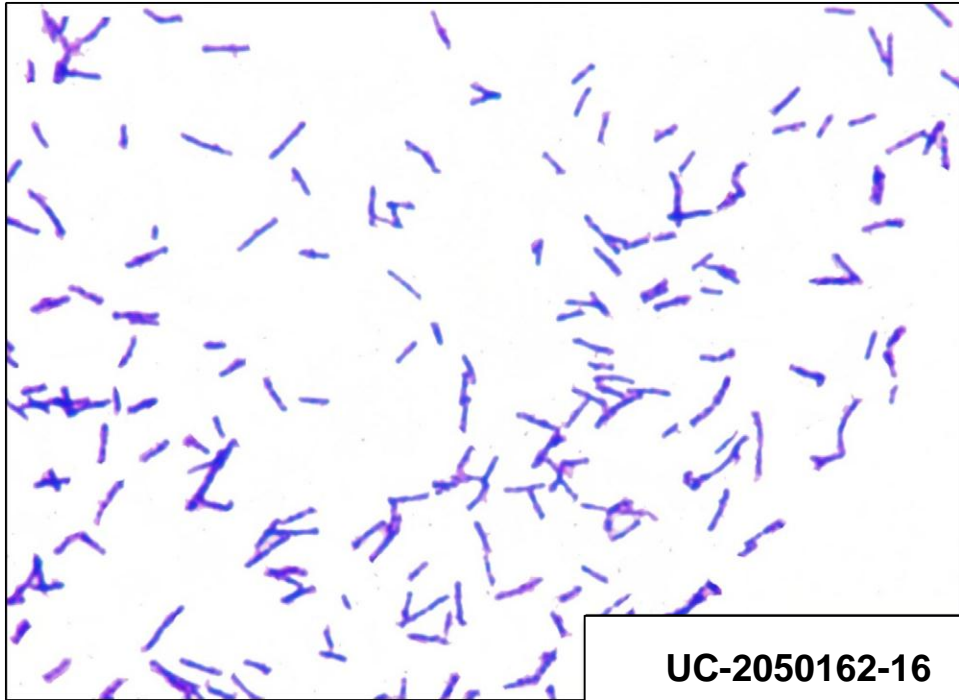
UC-2050162-13



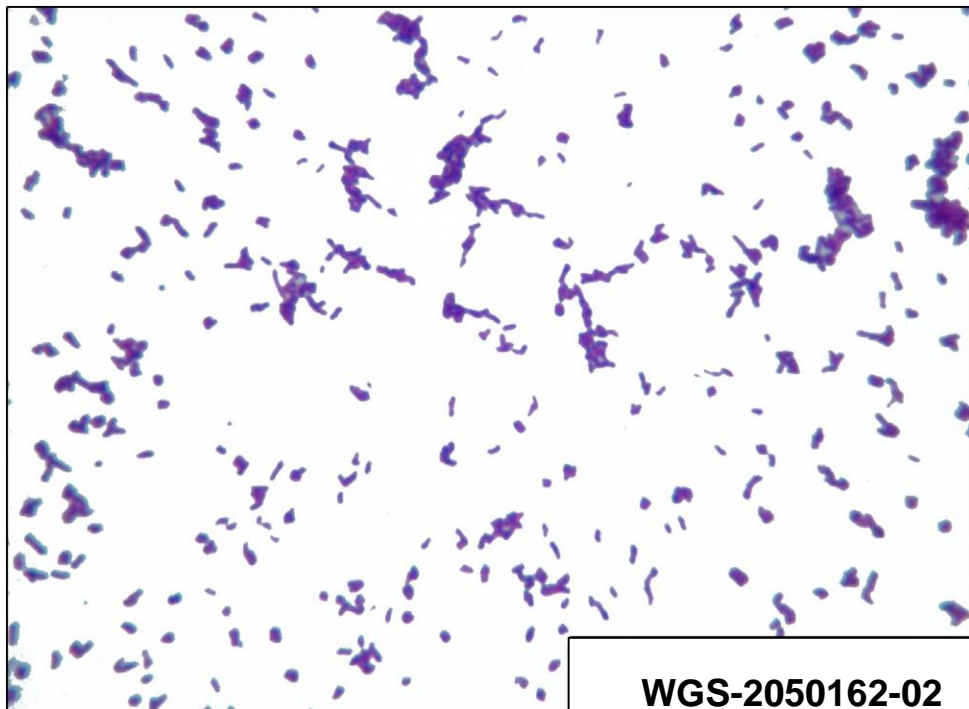
UC-2050162-14



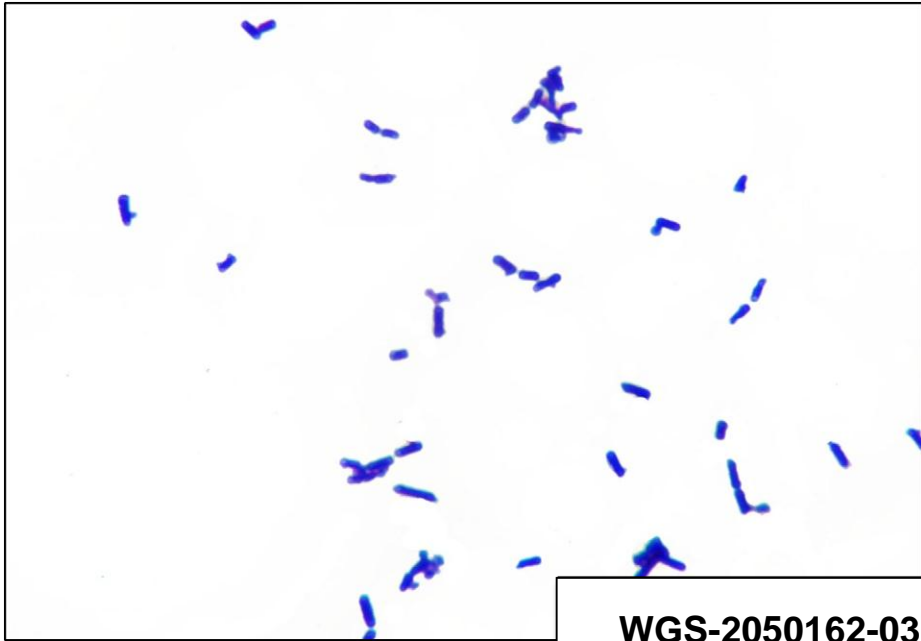
UC-2050162-15



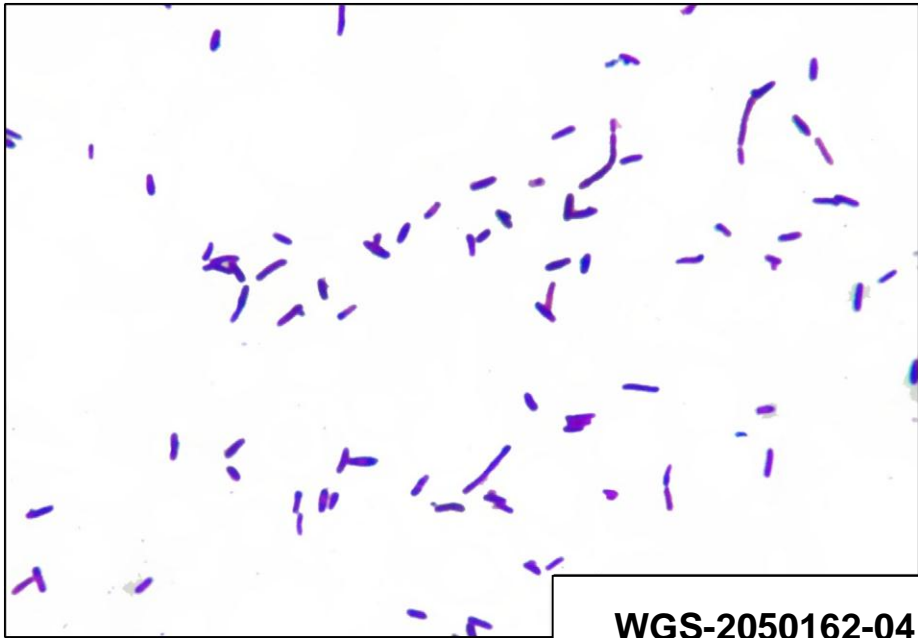
UC-2050162-16



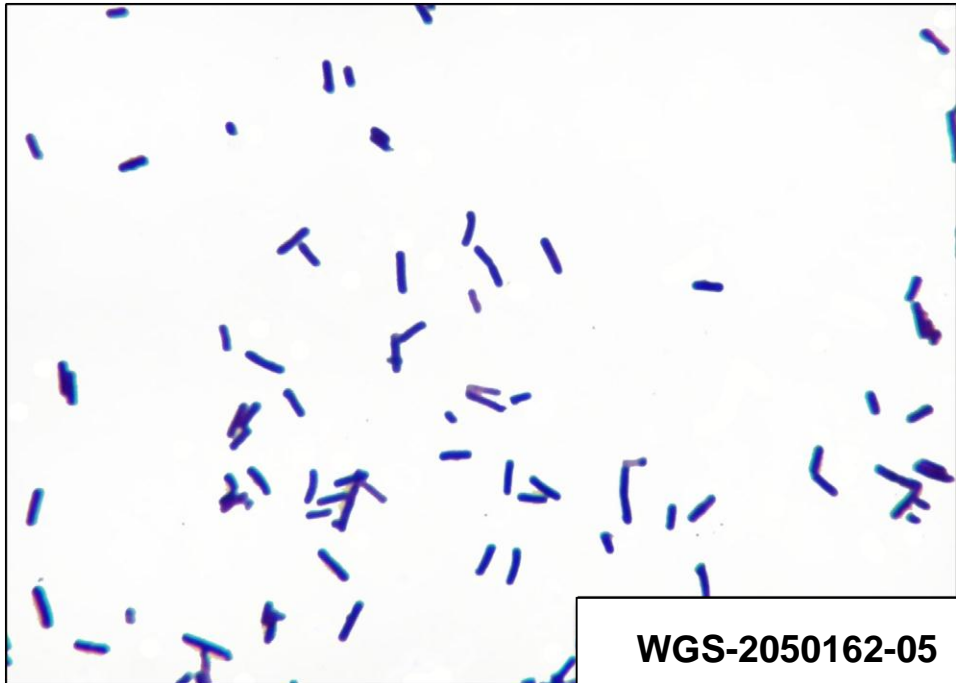
WGS-2050162-02



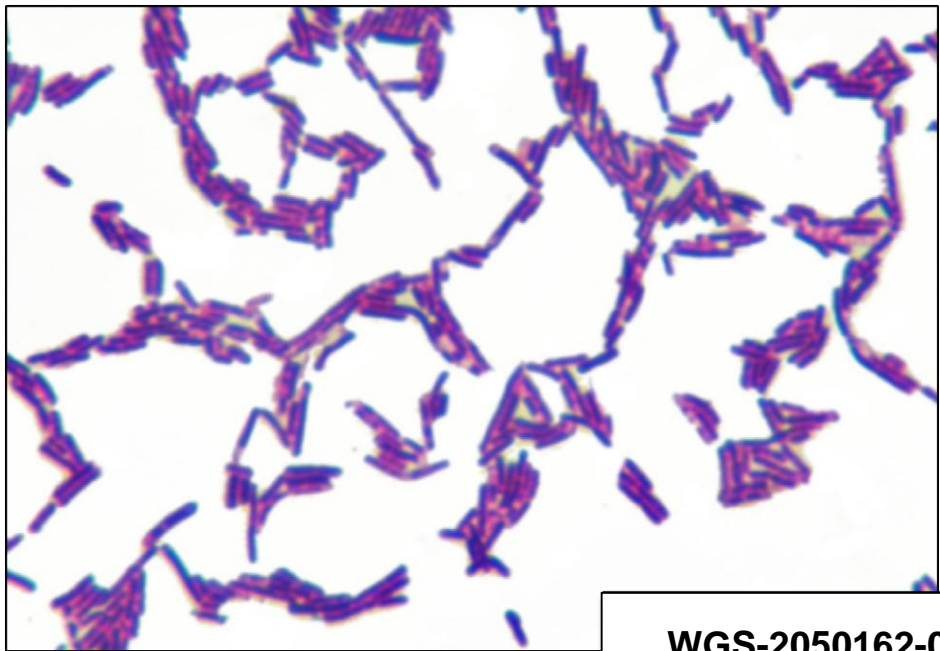
WGS-2050162-03



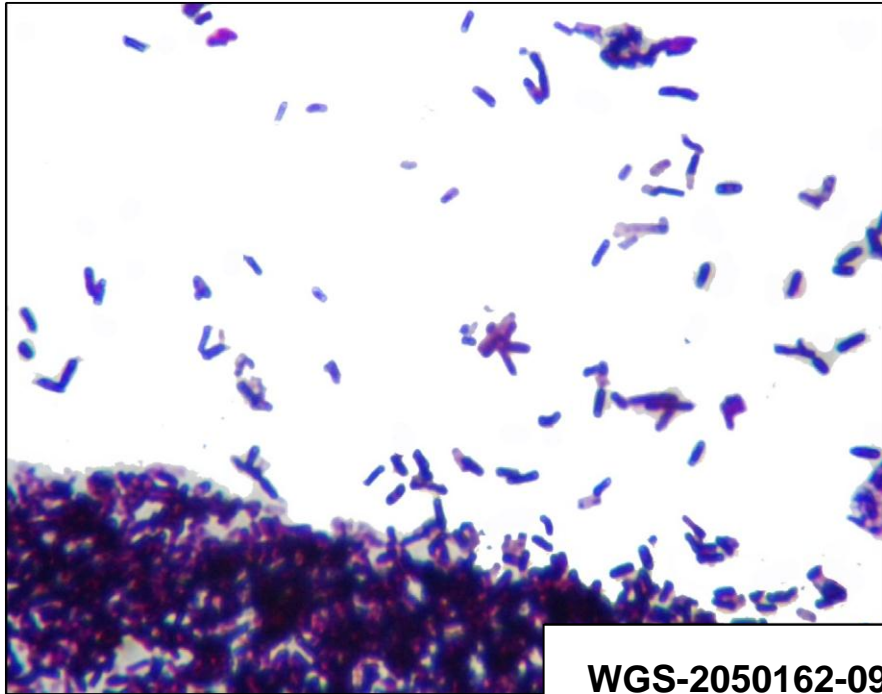
WGS-2050162-04



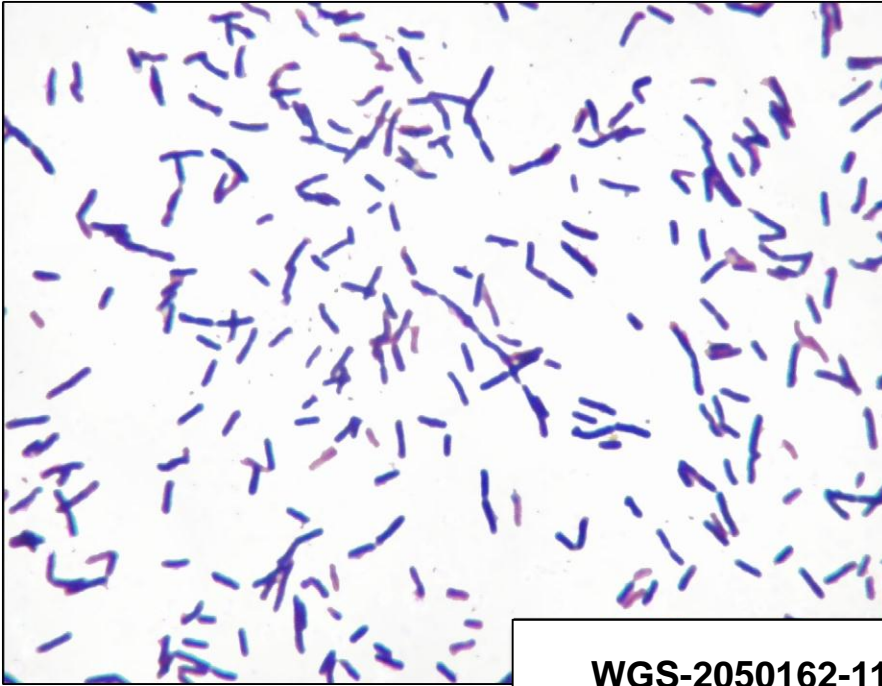
WGS-2050162-05



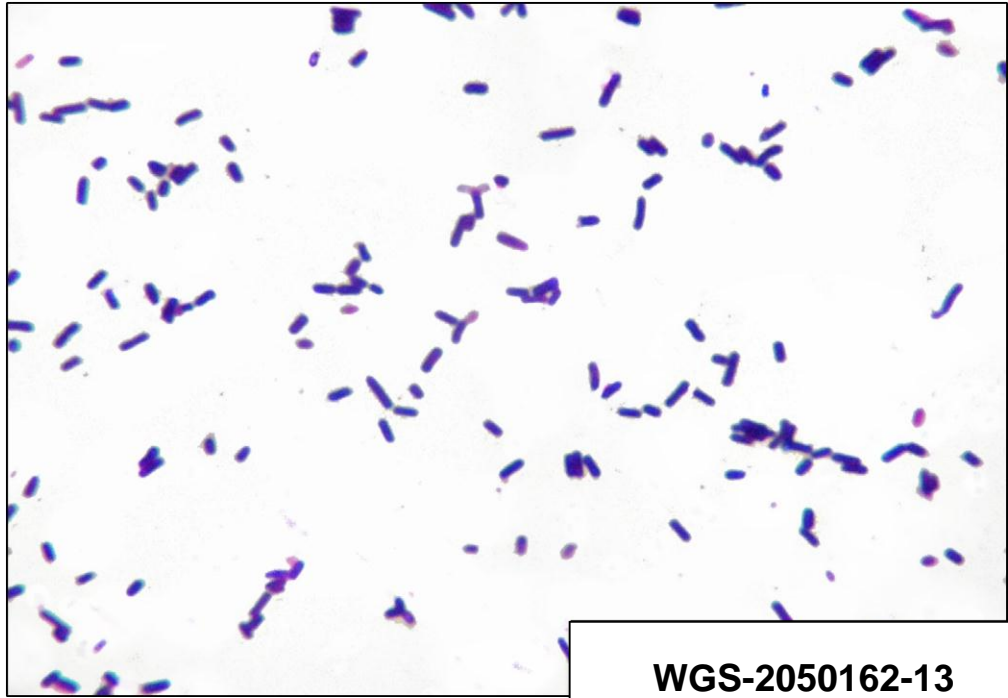
WGS-2050162-06



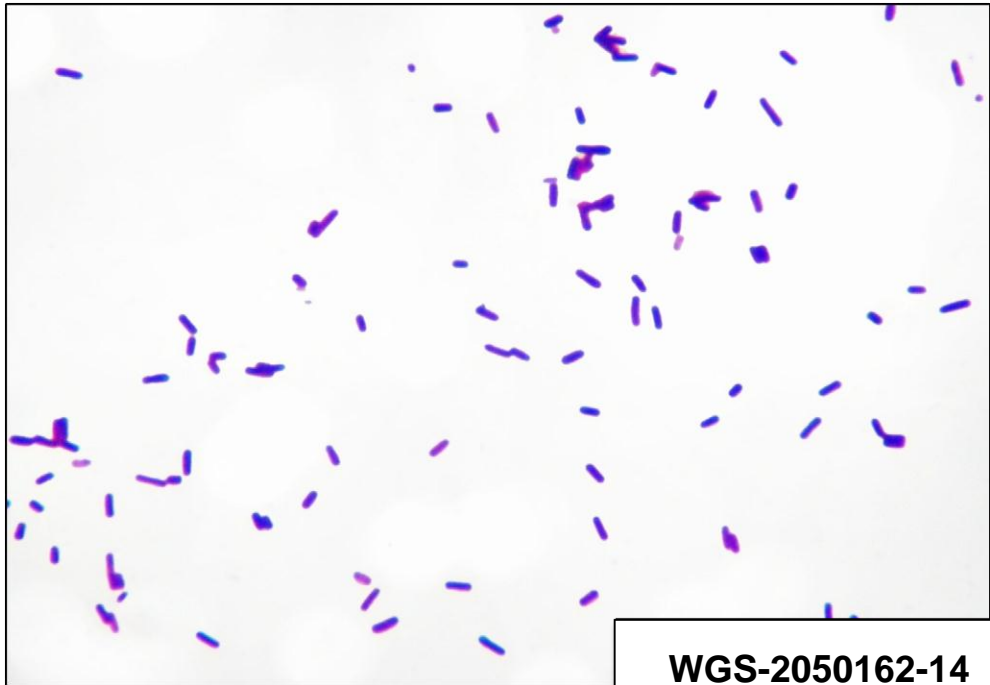
WGS-2050162-09



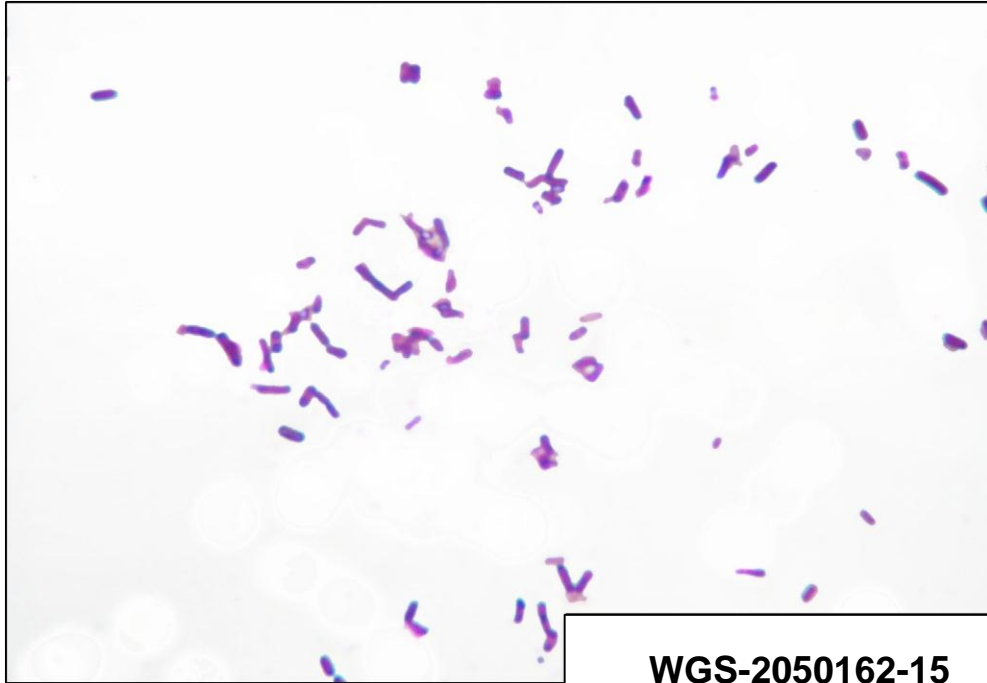
WGS-2050162-11



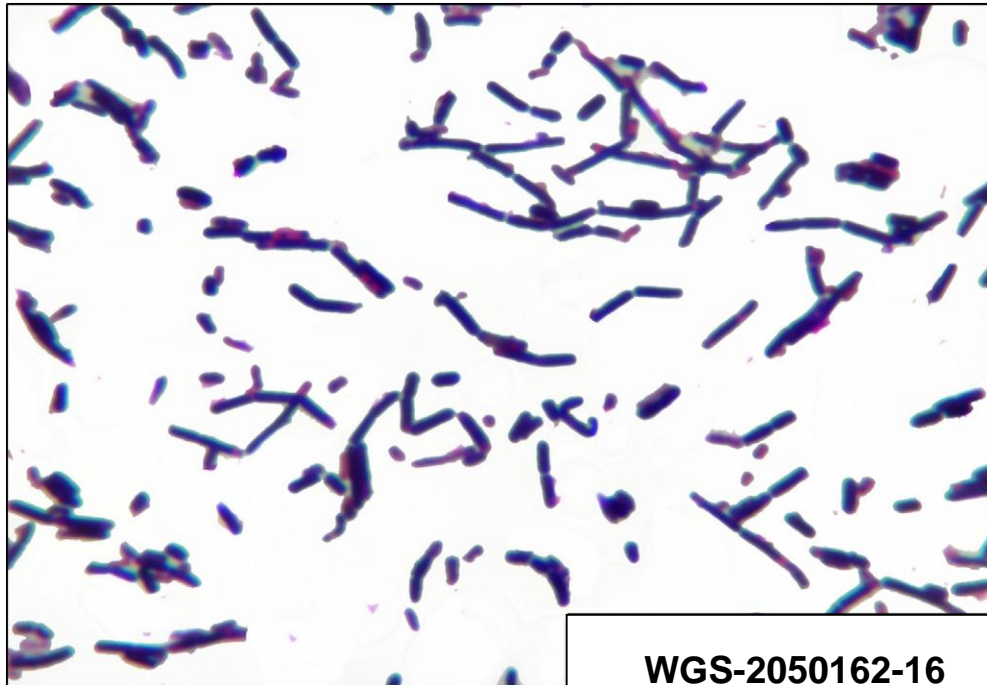
WGS-2050162-13



WGS-2050162-14



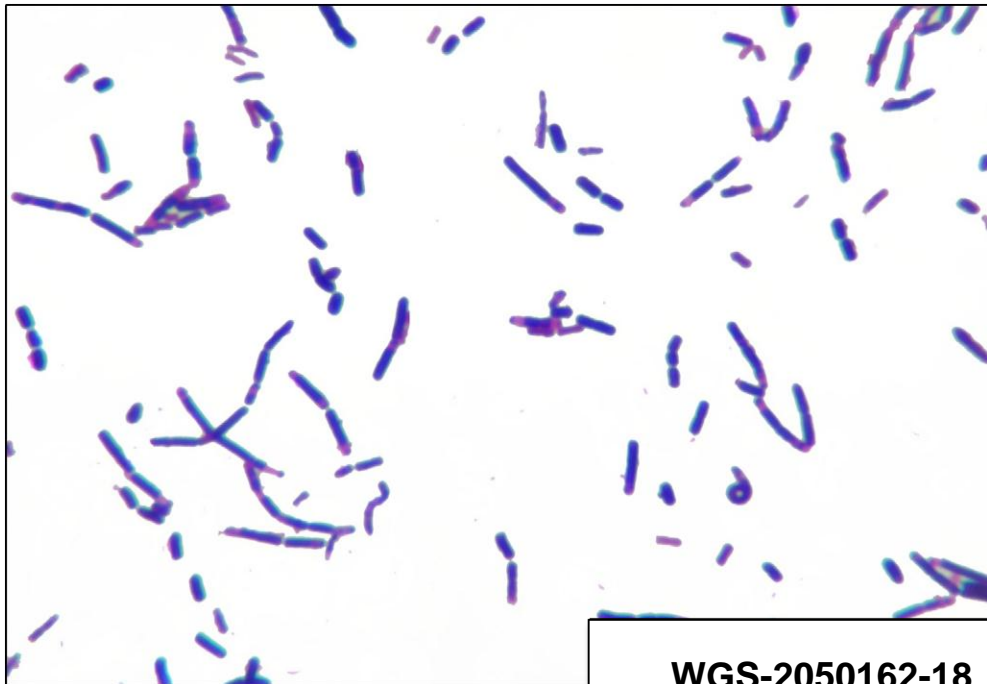
WGS-2050162-15



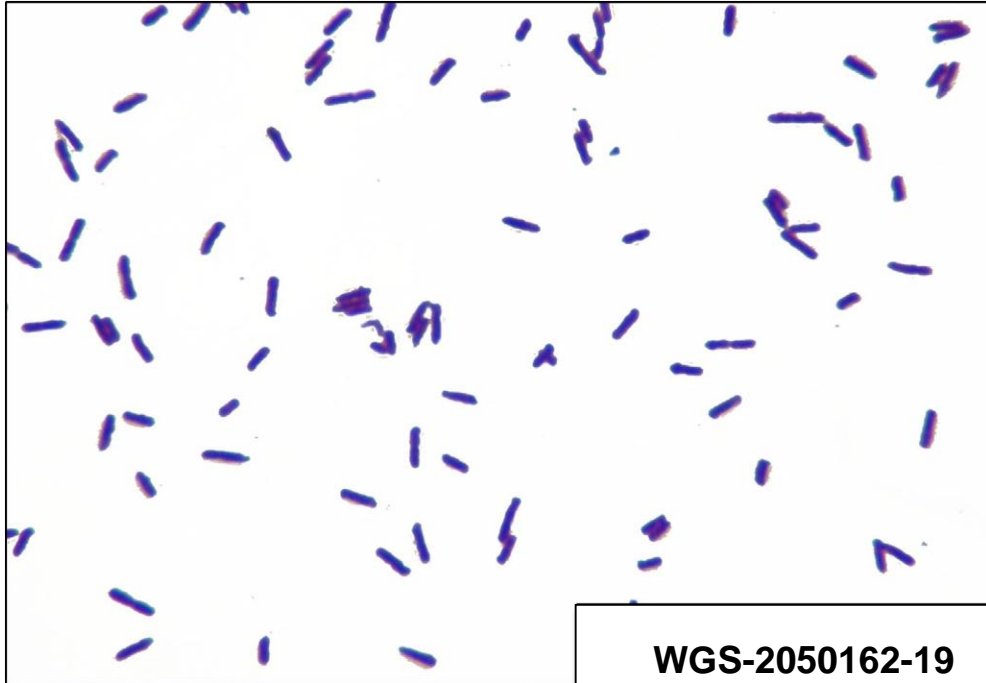
WGS-2050162-16



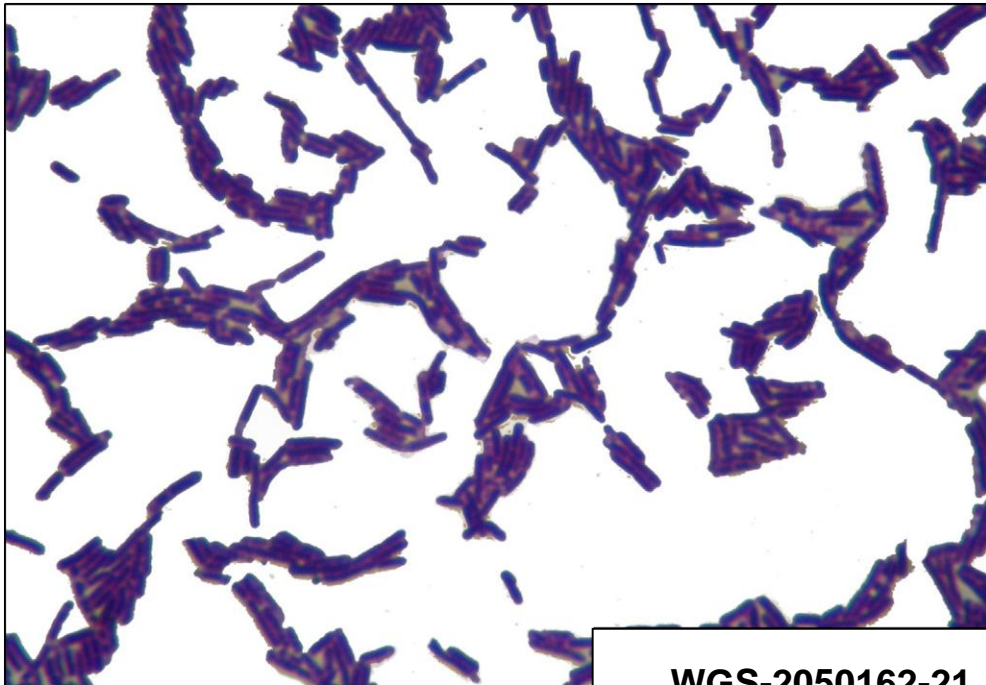
WGS-2050162-17



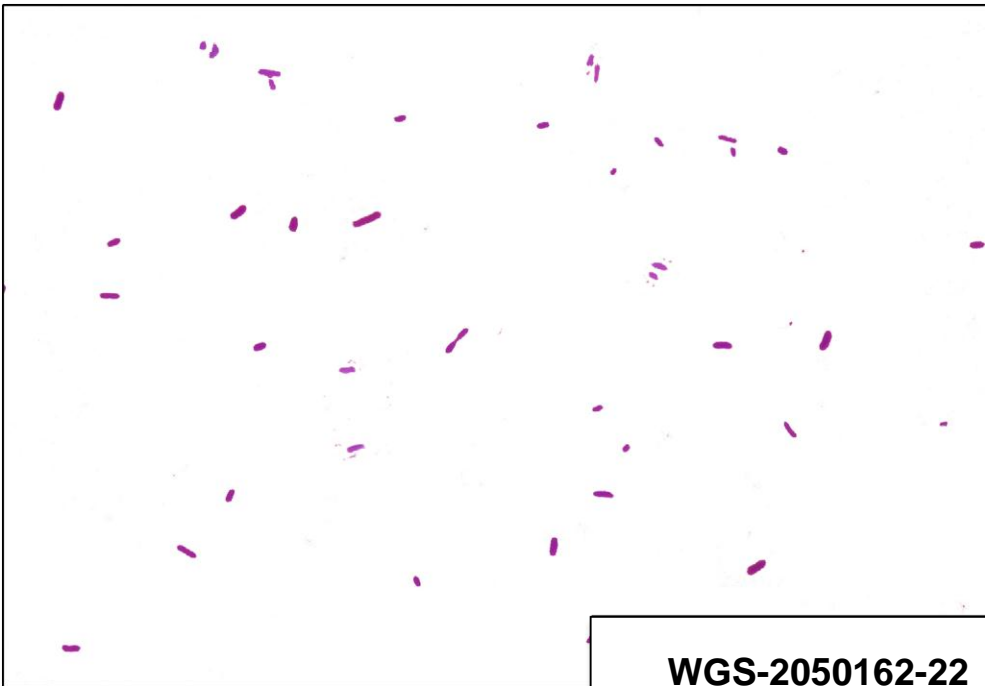
WGS-2050162-18



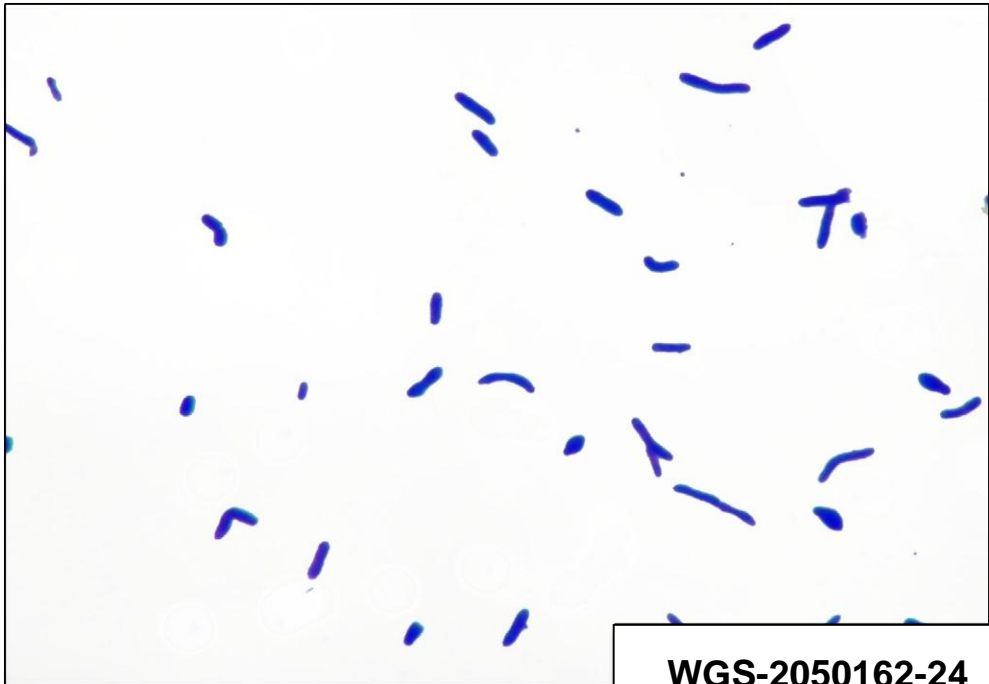
WGS-2050162-19



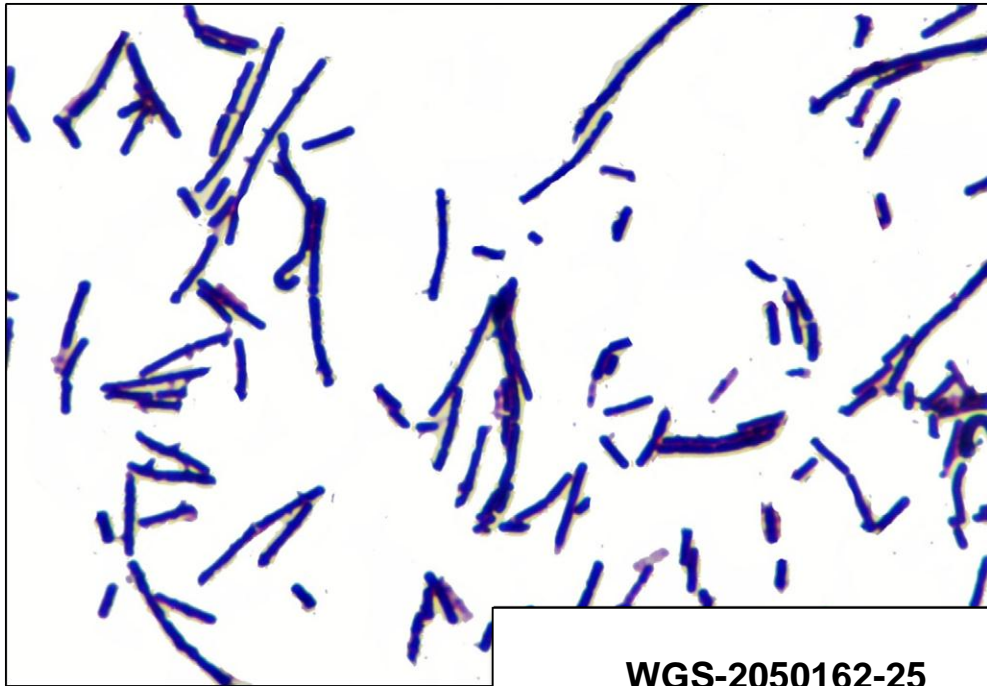
WGS-2050162-21



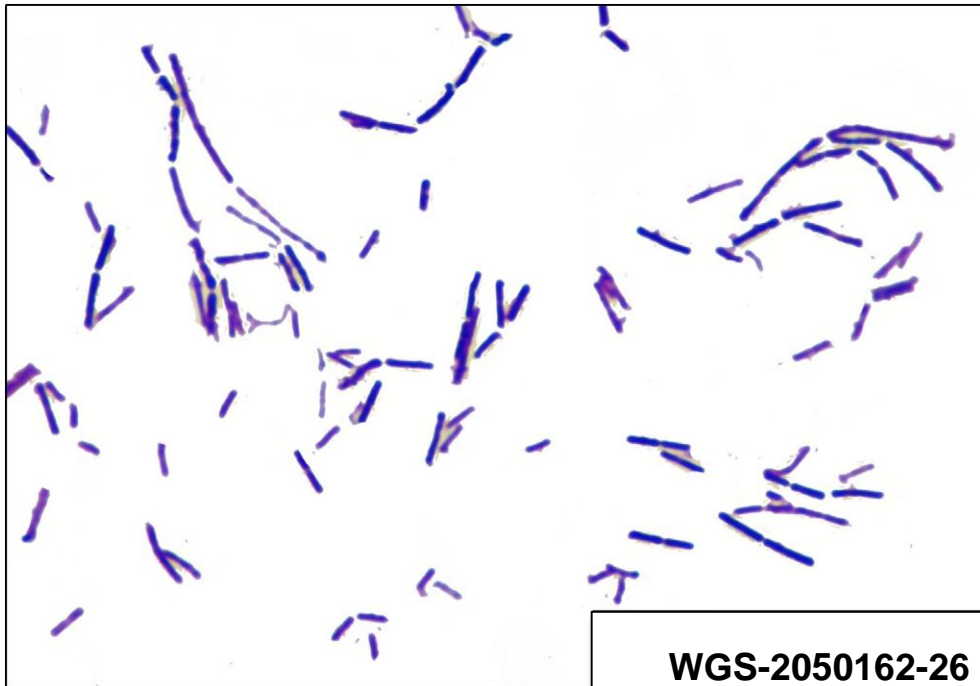
WGS-2050162-22



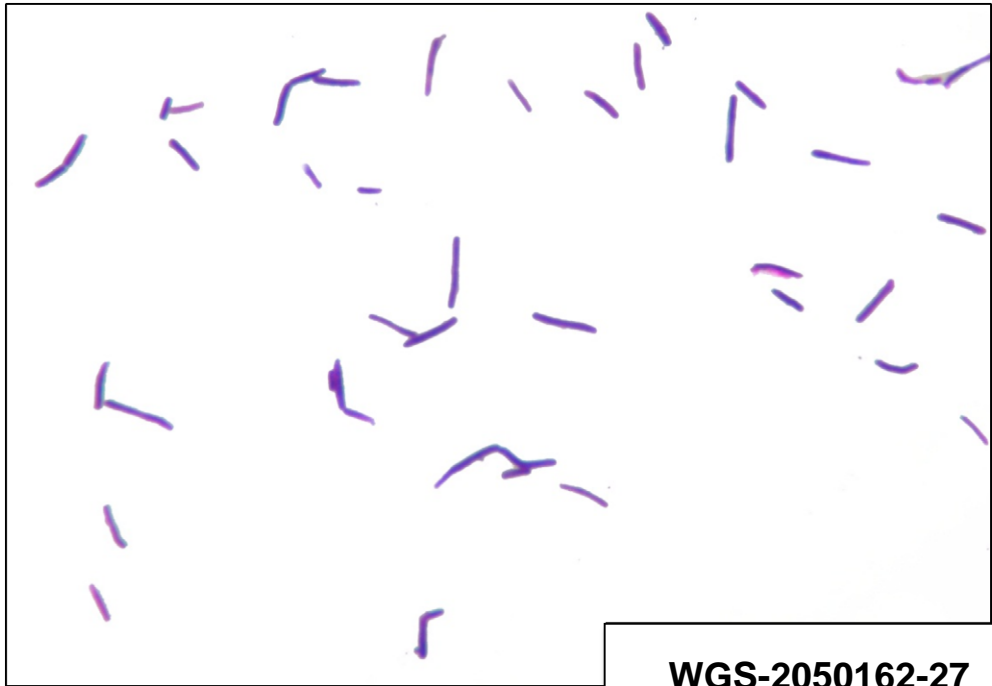
WGS-2050162-24



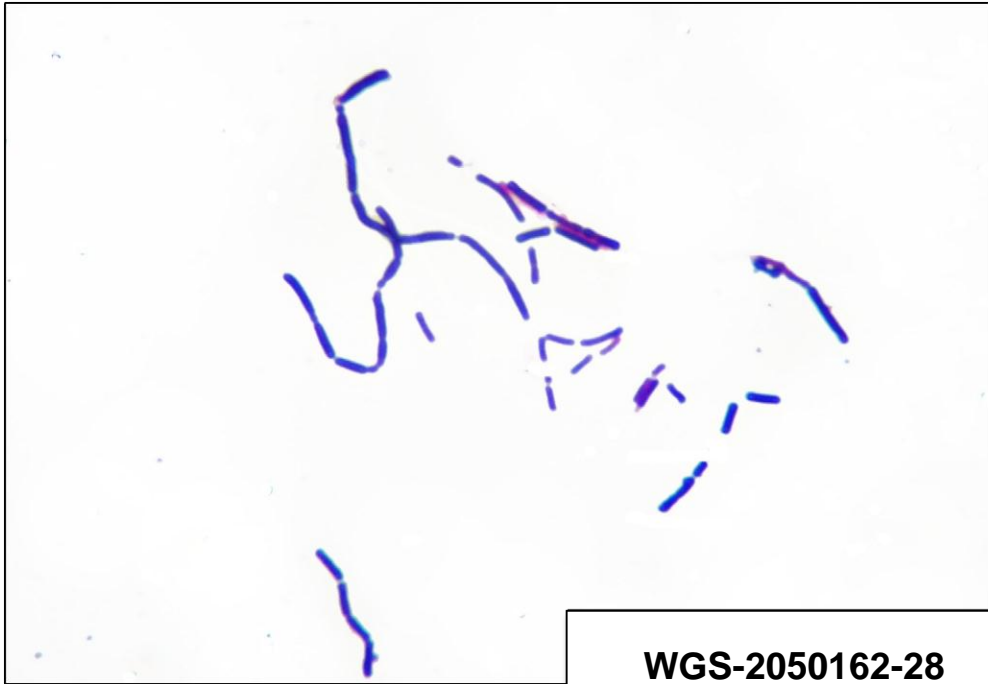
WGS-2050162-25



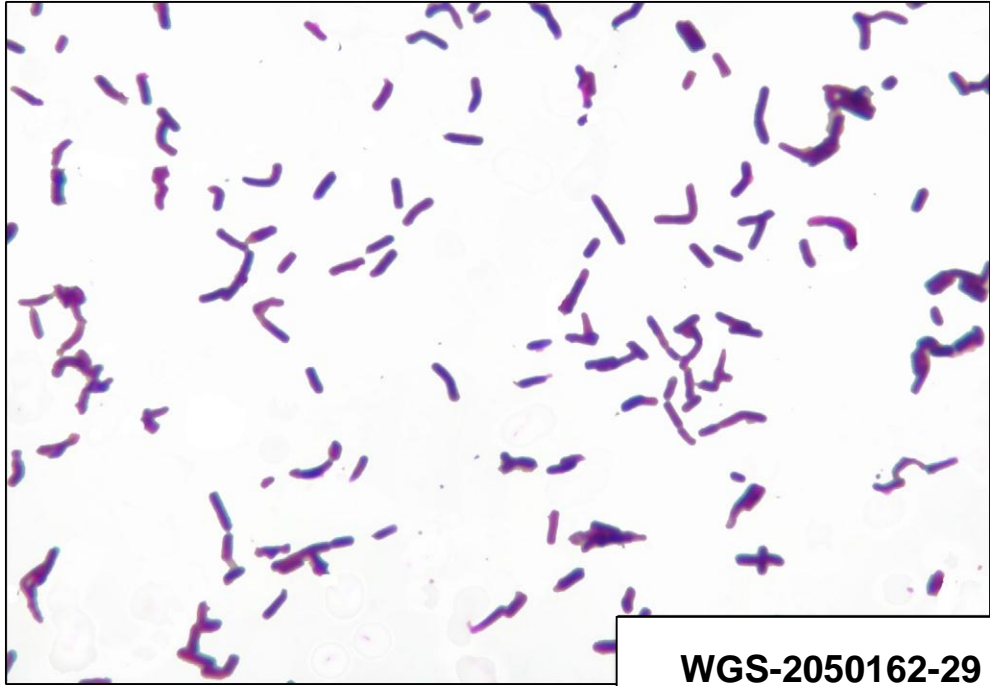
WGS-2050162-26



WGS-2050162-27



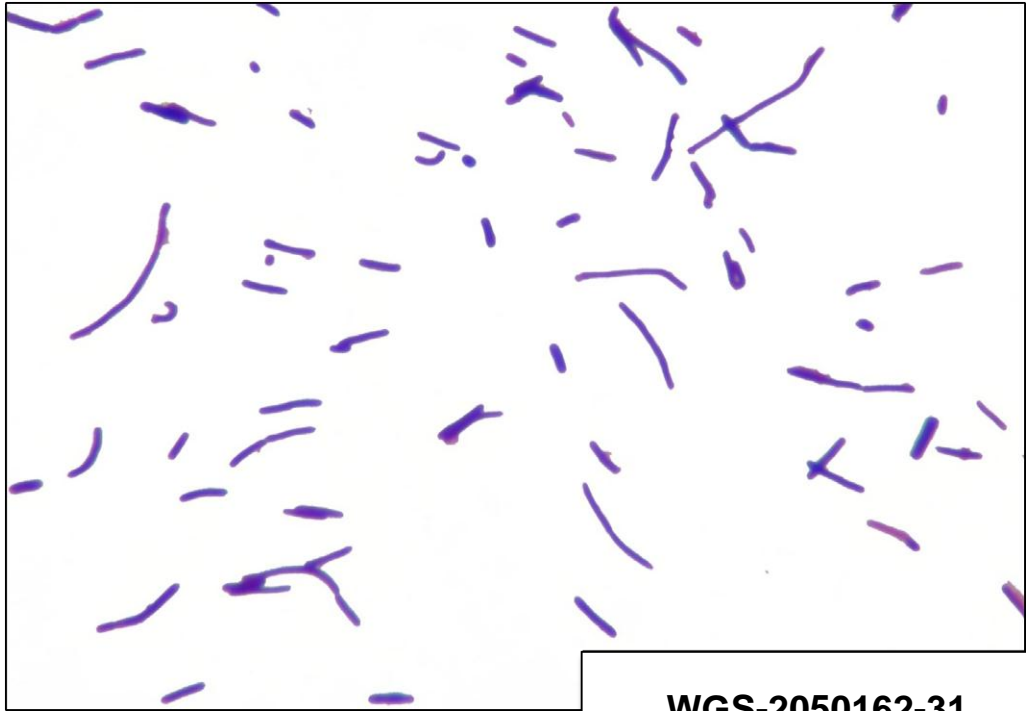
WGS-2050162-28



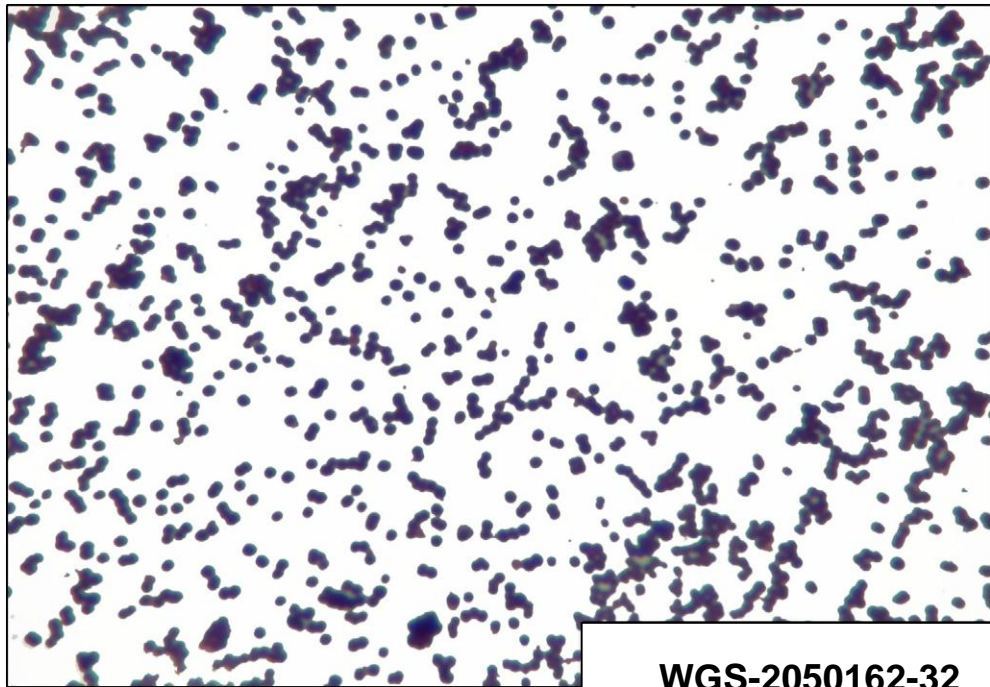
WGS-2050162-29



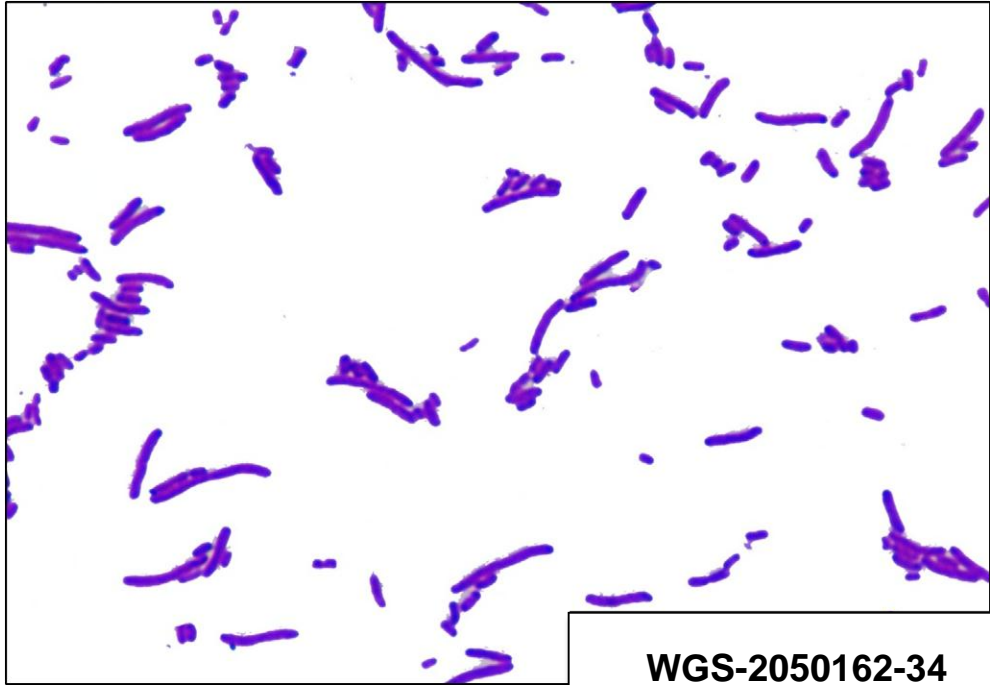
WGS-2050162-30



WGS-2050162-31



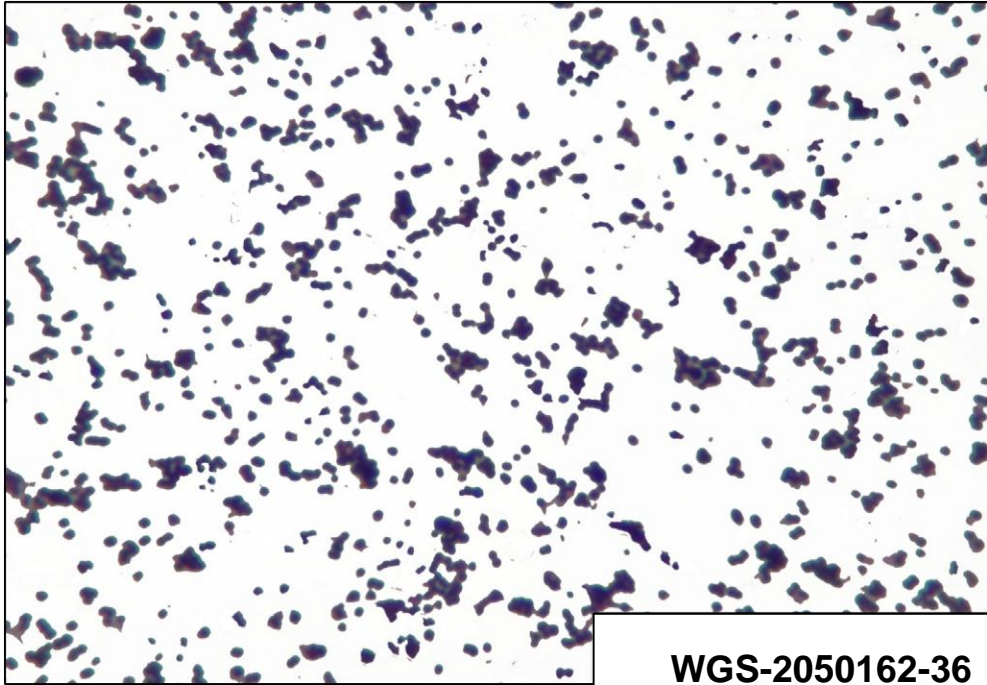
WGS-2050162-32



WGS-2050162-34



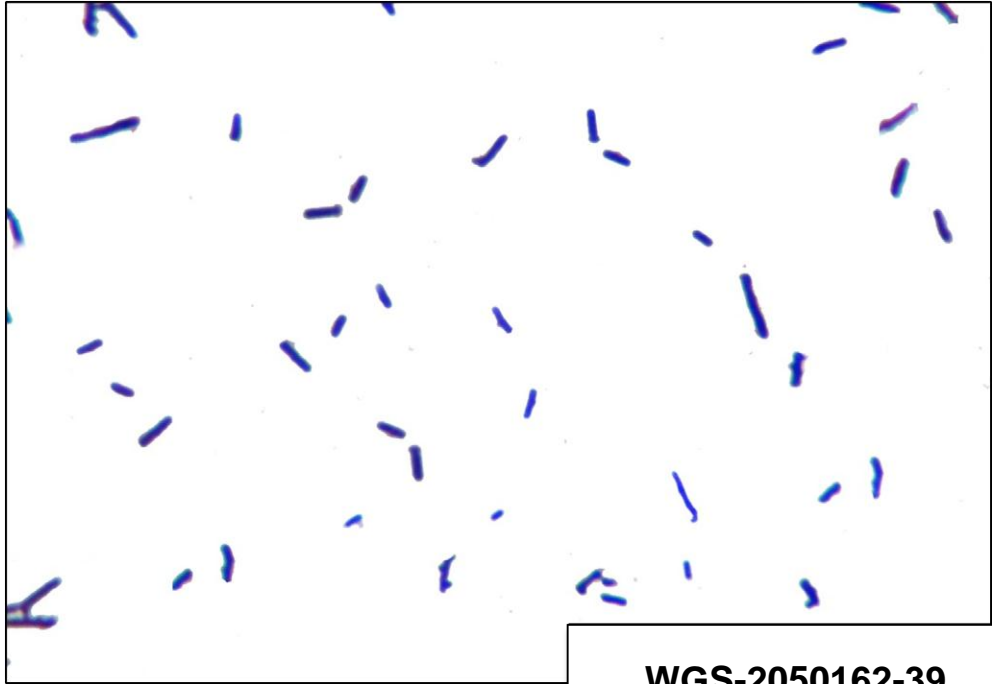
WGS-2050162-35



WGS-2050162-36

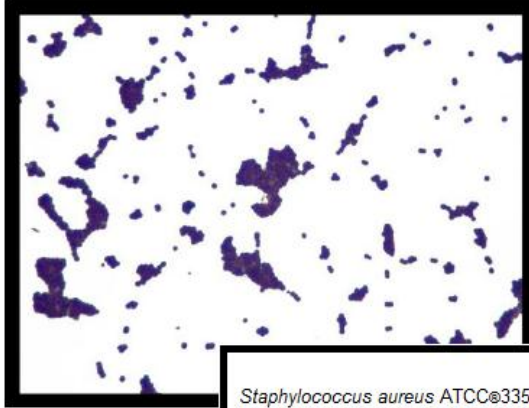


WGS-2050162-38

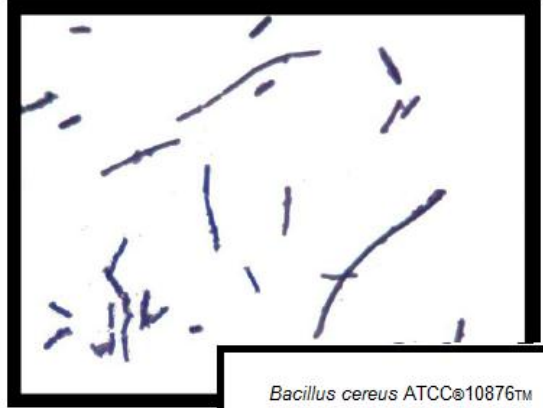


WGS-2050162-39

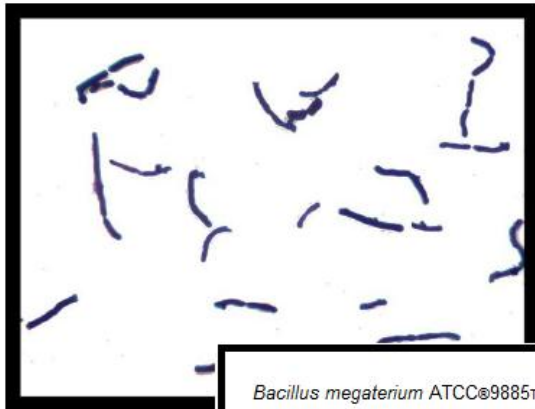
Anexo 2. Morfología celular de los aislados bacterianos estudiados de las cepas de referencia.



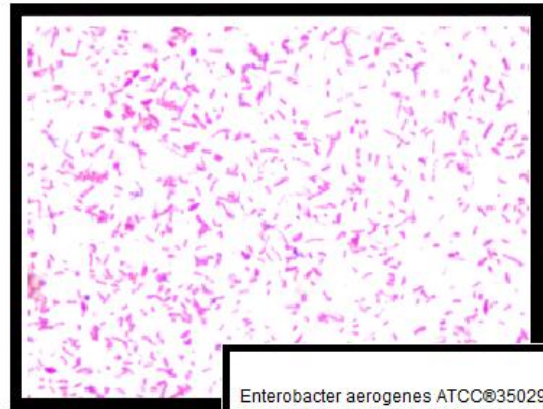
Staphylococcus aureus ATCC®33592™



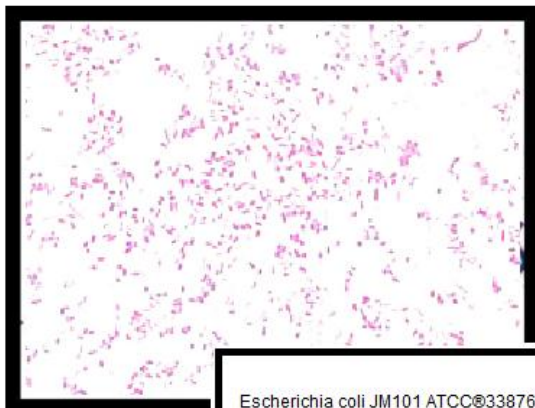
Bacillus cereus ATCC®10876™



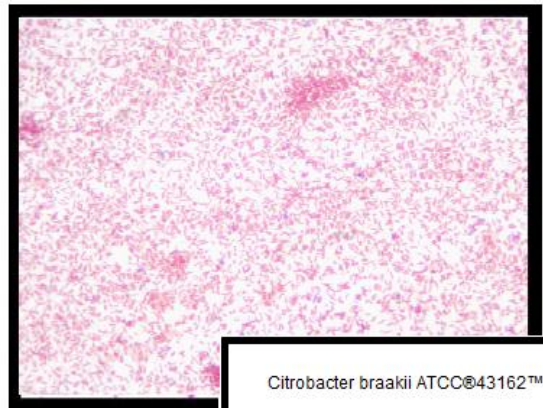
Bacillus megaterium ATCC®9885™



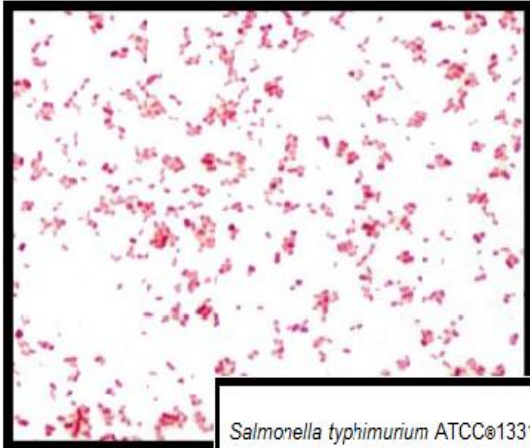
Enterobacter aerogenes ATCC®35029™



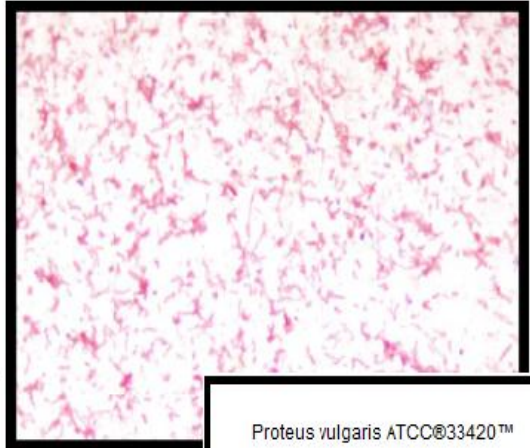
Escherichia coli JM101 ATCC®33876™



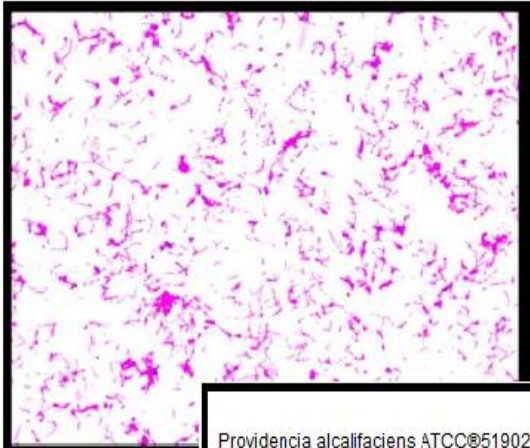
Citrobacter braakii ATCC®43162™



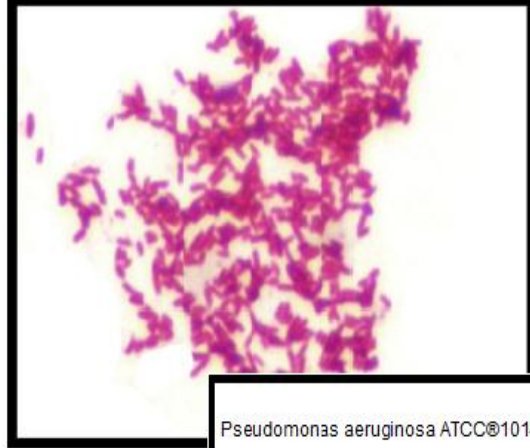
Salmonella typhimurium ATCC®13311™



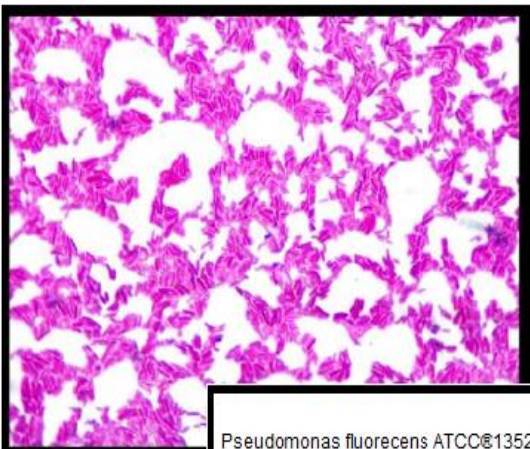
Proteus vulgaris ATCC®33420™



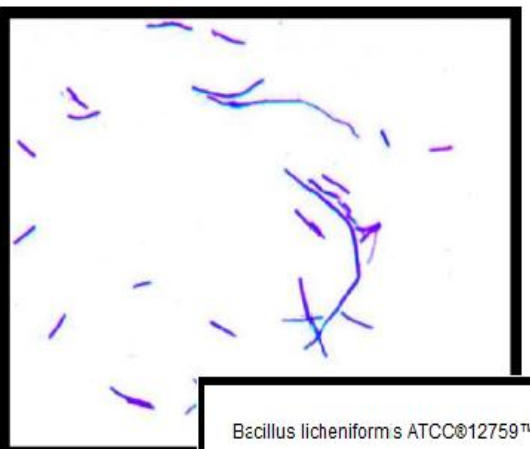
Providencia alcalifaciens ATCC®51902™



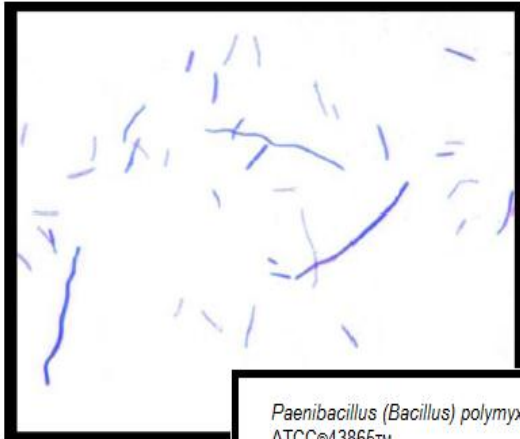
Pseudomonas aeruginosa ATCC®10145™



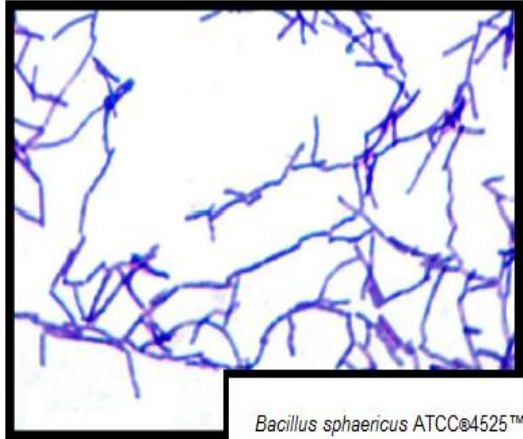
Pseudomonas fluorescens ATCC®13525™



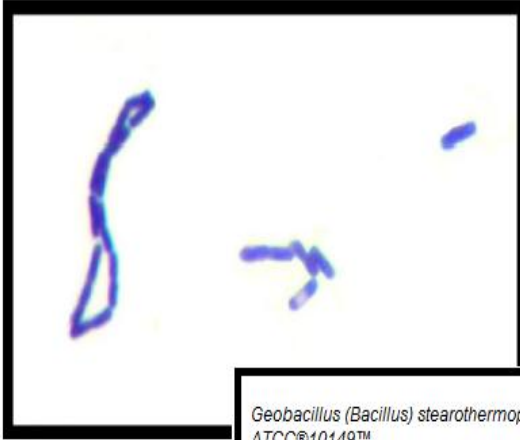
Bacillus licheniformis ATCC®12759™



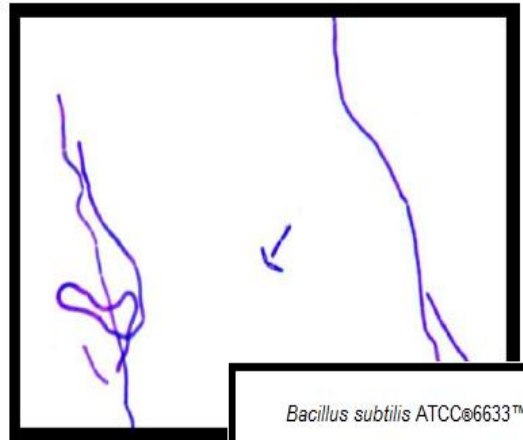
Paenibacillus (Bacillus) polymyxa
ATCC®43865™



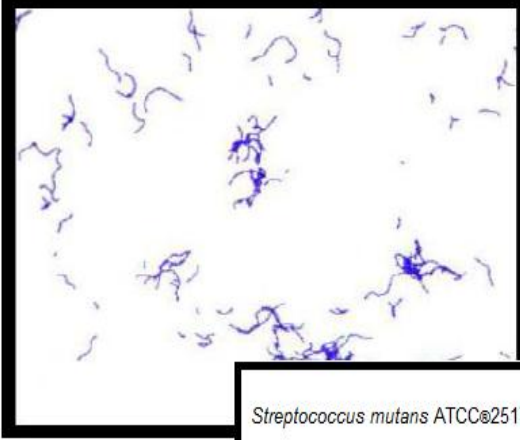
Bacillus sphaericus ATCC®4525™



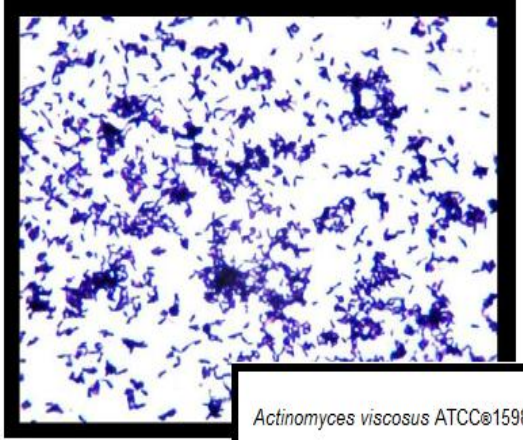
Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus
ATCC®10149™



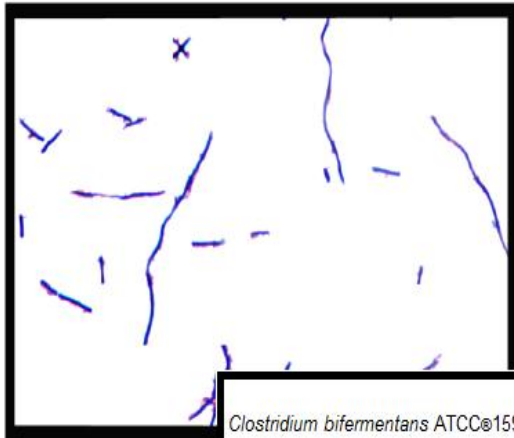
Bacillus subtilis ATCC®6633™



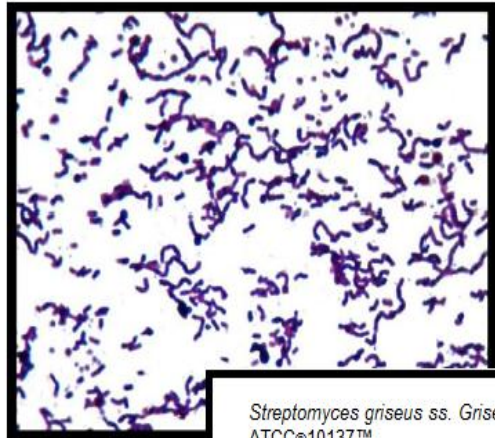
Streptococcus mutans ATCC®25175™



Actinomyces viscosus ATCC®15987™



Clostridium bifermentans ATCC®15987™



Streptomyces griseus ss. *Griseus* ATCC®10137™

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

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	MEDIO	CN	MORFOLOGIA CELULAR				PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO								
			GS	SF	BF	MO	OXI	CAT	OXI	MC1	MC2	EMB	CIT	ONPG	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33592™	NB	08/08/2011	+	-	C	-	F	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 10876™	NB	08/08/2011	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	+	-	
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC® 9885™	NB	08/08/2011	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 35029™	NB	08/08/2011	-	-	B	+	F	+	+	+	+	-	+	-	
<i>Escherichia coli</i> JM101 ATCC® 33876™	NB	08/08/2011	-	-	B	+	F	+	-	+	-	-	-	-	
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC® 43162™	NB	08/08/2011	-	-	B	+	F	+	-	+	+	-	+	-	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311™	NB	08/08/2011	-	-	B	+	F	+	-	+	-	-	+	-	
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420™	NB	08/08/2011	-	-	B	+	F	+	-	+	-	-	-	-	
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	NB	09/08/2011	-	-	B	+	F	+	-	+	-	-	+	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145™	P	05/10/2011	-	-	B	+	Ae	+	+	+	-	+	+	-	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC®13525	P	02/02/2012	-	-	B	+	Ae	+	+	+	-	+	+	-	
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC®12759	NB	15/09/2011	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Paenibacillus (Bacillus) polymyxa</i> ATCC®43865	TP	08/08/2011	+	+	B	+	F	+	+	-	-	+	-	-	
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC®4525	NB	26/01/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus</i> ATCC®10149	NB	22/07/2011	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC®6633	NB	22/07/2011	+	+	B	+	An	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175	RCM	01/09/2011	+	-	C	-	An	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC®15987	RCM	03/12/2011	+	-	C	-	An	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptomyces griseus</i> ss. <i>Griseus</i> ATCC 10137	NB	17/03/2012	+	+	C	-	F	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Clostridium bifermentans</i> ATCC®10137	RCM	03/12/2011	+	+	B	+	An	-	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-02	NA	02/04/2012	+	-	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-03	NA	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-04	NA	02/04/2012	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-05	NA	02/04/2012	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-06	NA	02/04/2012	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	+	-	
WGS-2050162-09	M9Yglu	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-11	M9Yglu	28/11/2011	+	-	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-13	M9Yglu	06/10/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-14	M9Yglu	06/10/2012	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-15	M9Yglu	06/10/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	MEDIO	CN	MORFOLOGIA CELULAR				PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO								
			GS	SF	B	MO	OXI	CAT	OXI	MC1	MC2	EMB	CIT	ONPG	
WGS-2050162-16	M9Yglu	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-17	M9Yglu	02/04/2012	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-18	M9Yglu	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-19	M9Yglu	02/04/2012	+	-	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-22	M9Yglu	06/10/2012	-	-	B	+	F	+	-	+	+	-	+	-	
WGS-2050162-23	M9Ygly	28/11/2011	+	-	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-24	M9Ygly	03/09/2013	+	+	B	+	F	-	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-25	M9Ygly	28/11/2011	+	+	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-26	M9Ygly	05/02/2013	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-27	M9Ygly	05/02/2013	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-28	M9Ygly	01/11/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	+	-	
WGS-2050162-29	M9Ygly	05/02/2013	+	-	B	+	Ae	+	-	+	+	-	-	-	
WGS-2050162-30	M9Ygly	28/01/2013	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-31	M9Ygly	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	+	-	
WGS-2050162-32	M9Ygly	01/12/2011	+	+	C	-	F	-	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-34	M9Ygly	05/02/2013	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-35	M9Ygly	06/10/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-36	M9Ygly	01/12/2011	+	+	C	-	F	-	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-38	M9Ygly	12/09/2013	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
WGS-2050162-39	M9Ygly	05/02/2013	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-01	NA	03/09/2013	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-03	NA	16/11/2011	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-04	NA	16/11/2011	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-05	NA	16/11/2011	+	+	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-06	NA	16/11/2011	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-07	NA	16/11/2011	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-08	NA	16/11/2011	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-09	M9Yglu	28/11/2011	-	-	B	+	F	+	-	+	+	-	+	-	

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	MEDIO	CN	MORFOLOGIA CELULAR				PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO								
			GS	SF	B	MO	OXI	CAT	OXI	MC1	MC2	EMB	CIT	ONPG	
MGS-2050162-10	M9Yglu	03/09/2013	-	-	B	+	F	-	-	+	+	-	+	-	
MGS-2050162-11	M9Yglu	28/11/2011	-	-	B	+	F	+	-	-	-	-	+	-	
MGS-2050162-12	M9Yglu	28/11/2011	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-13	M9Yglu	06/10/2012	+	-	B	+	Ae	+	+	+	+	-	+	-	
MGS-2050162-14	M9Yglu	06/10/2012	+	+	B	+	F	+	+	+	+	-	-	-	
MGS-2050162-15	M9Yglu	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	+	+	+	-	+	-	
MGS-2050162-17	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-18	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-19	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-20	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-21	M9Y	05/02/2013	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-22	M9Y	06/10/2012	+	+	B	+	Ae	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-23	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-24	M9Y	06/10/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-25	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-26	M9Y	06/10/2012	+	+	B	+	F	+	+	+	+	-	-	-	
MGS-2050162-27	M9Y	06/10/2012	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-29	M9Y	01/12/2011	+	+	C	-	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-30	M9Y	01/12/2011	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-31	M9Y	01/12/2011	+	-	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-32	M9Y	12/09/2013	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-33	M9Y	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-34	M9Yglu	06/10/2012	+	-	B	+	F	+	-	+	-	-	-	-	
MGS-2050162-35	M9Ygly	06/10/2012	+	-	B	+	F	-	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-36	M9Ygly	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-38	M9Ygly	06/10/2012	+	-	B	+	Ae	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-39	M9Ygly	28/11/2011	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
MGS-2050162-40	M9Ygly	12/09/2013	-	-	B	+	F	+	-	+	+	-	+	-	
UC- 2050162-01	M9Y	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-02	M9Y	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	MEDIO	CN	MORFOLOGIA CELULAR				PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO								
			G.P	SF	B	MO	OXI	CAT	OXI	MC+	MC2	EMB	CIT	ONPG	
UC- 2050162-03	M9Y	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-04	M9Y	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-05	M9Y	02/04/2012	+	+	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-06	M9Y	02/04/2012	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-07	M9Y	28/01/2013	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-08	M9Y	28/01/2013	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-09	M9Y	28/01/2013	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-10	M9Y	28/01/2013	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-11	M9Y	28/01/2013	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-12	M9Y	28/01/2013	+	+	B	+	F	-	+	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-13	RCM	14/01/2013	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-14	RCM	14/01/2013	+	-	B	+	F	-	-	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-15	RCM	14/01/2013	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	
UC- 2050162-16	RCM	14/01/2013	+	-	B	+	F	+	-	-	-	-	-	-	

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO															
	Lac (G)	Lac (Ac)	Gly (G)	Gly (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)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33592™	-	-	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 10876™	-	+	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC® 9885™	-	-	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 35029™	-	+	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Escherichia coli</i> JM101 ATCC® 33876™	-	+	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC® 43162™	-	+	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311™	-	+	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420™	-	-	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145™	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC®13525	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC®12759	-	+	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paenibacillus (Bacillus) polymyxa</i> ATCC®43865	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC®4525	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus</i> ATCC®10149	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC®6633	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC®15987	-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces griseus</i> ss. <i>Griseus</i> ATCC 10137	-	-	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Clostridium bifermentans</i> ATCC®10137	-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-02	-	+	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-03	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-04	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-05	-	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-06	-	+	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-09	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-11	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-13	-	-	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-14	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-15	-	-	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-16	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-17	-	+	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

Anexo 3 Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO															
	Lac (G)	Lac (Ac)	Gly (G)	Gly (Ac)	Mal (G)	Mal (G)	Suc (G)	Suc (Ac)	Glu (G)	Glu (Ac)	Ace (G)	Ace (Ac)	Eta (G)	Eta (Ac)	Man (G)	Man (Ac)
WGS-2050162-18	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-19	-	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-22	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-23	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-24	-	-	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-25	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-26	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
WGS-2050162-27	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-28	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-29	-	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-30	-	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-31	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-32	-	-	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-34	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-35	-	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-36	-	-	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-38	-	-	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
WGS-2050162-39	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-01	-	-	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-03	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-04	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-05	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-06	-	+	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-07	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-08	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-09	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-10	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-11	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-12	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-13	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-14	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Anexo3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO															
	Lac (G)	Lac (Ac)	Gly (G)	Gly (Ac)	Mal (G)	Mal (G)	Suc (G)	Suc (Ac)	Glu (G)	Glu (Ac)	Ace (G)	Ace (Ac)	Eta (G)	Eta (Ac)	Man (G)	Man (Ac)
MGS-2050162-15	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-17	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-18	-	+	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-19	-	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-20	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-21	-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-22	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-23	-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-24	-	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-25	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-26	-	+	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-27	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-29	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-30	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-31	-	+	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-32	-	-	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-33	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-34	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-35	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-36	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-38	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-39	-	-	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
MGS-2050162-40	-	-	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-01	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-02	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-03	-	+	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-04	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-05	-	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-06	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-07	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-08	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO															
	Lac (G)	Lac (Ac)	Gly (G)	Gly (Ac)	Mal (G)	Mal (G)	Suc (G)	Suc (Ac)	Glu (G)	Glu (Ac)	Ace (G)	Ace (Ac)	Eta (G)	Eta (Ac)	Man (G)	Man (Ac)
UC- 2050162-09	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-10	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-11	-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-12	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-13	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-14	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-15	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UC- 2050162-16	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO												
	RM	VP	URE	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	IND	GEL	MS+	MS2	DNA	ALM	C 50 °C	C 65°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 33592™	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 10876™	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC® 9885™	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 35029™	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> JM101 ATCC® 33876™	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC® 43162™	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311™	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 33420™	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Providencia alcalifaciens</i> ATCC® 51902™	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145™	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC®13525	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC®12759	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Paenibacillus (Bacillus) polymyxa</i> ATCC®43865	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC®4525	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus</i> ATCC®10149	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC®6633	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC®15987	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Streptomyces griseus</i> ss. <i>Griseus</i> ATCC 10137	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Clostridium bifermentans</i> ATCC®10137	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
WGS-2050162-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WGS-2050162-03	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
WGS-2050162-04	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-05	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
WGS-2050162-06	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-09	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
WGS-2050162-11	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
WGS-2050162-13	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
WGS-2050162-14	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-15	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
WGS-2050162-16	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO												
	RM	VP	URE	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	IND	GEL	MS+	MS2	DNA	ALM	C 50 °C	C 65°C
WGS-2050162-17	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
WGS-2050162-18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
WGS-2050162-19	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
WGS-2050162-22	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
WGS-2050162-23	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-24	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-25	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-26	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
WGS-2050162-27	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-28	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
WGS-2050162-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
WGS-2050162-30	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
WGS-2050162-31	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
WGS-2050162-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
WGS-2050162-34	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
WGS-2050162-35	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
WGS-2050162-36	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
WGS-2050162-38	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
WGS-2050162-39	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-01	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
MGS-2050162-03	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
MGS-2050162-04	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-05	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-06	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-07	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-08	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-09	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MGS-2050162-10	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MGS-2050162-11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO												
	RM	VP	URE	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	IND	GEL	MS+	MS2	DNA	ALM	C 50 °C	C 65°C
MGS-2050162-12	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
MGS-2050162-13	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
MGS-2050162-14	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-15	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MGS-2050162-17	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-18	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-19	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-20	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-21	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-22	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MGS-2050162-23	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MGS-2050162-24	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-25	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-26	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-27	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
MGS-2050162-29	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MGS-2050162-30	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MGS-2050162-31	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-32	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MGS-2050162-33	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
MGS-2050162-34	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MGS-2050162-35	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MGS-2050162-36	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-38	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
MGS-2050162-39	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MGS-2050162-40	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
UC- 2050162-01	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
UC- 2050162-02	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
UC- 2050162-03	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
UC- 2050162-04	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
UC- 2050162-05	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Anexo 3. Continuación.

CODIGO PARA PUBLICACIÓN	PRUEBAS BIOQUIMICAS Y METABOLISMO												
	RM	VP	URE	H ₂ S (LEA)	H ₂ S (SIM)	IND	GEL	MS+	MS2	DNA	ALM	C 50 °C	C 65°C
UC- 2050162-06	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
UC- 2050162-07	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
UC- 2050162-08	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
UC- 2050162-09	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
UC- 2050162-10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
UC- 2050162-11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
UC- 2050162-12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
UC- 2050162-13	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
UC- 2050162-14	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
UC- 2050162-15	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
UC- 2050162-16	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

El código del aislado está relacionado con el origen del aislado (manto muestreado): (**WGS**: agua del surtidero, **MGS**: logo, **UC**: carbón); **CD**: fecha de conservación; **Medio**: 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; **M9YGly**: medio mínimo de sales M9 suplementado con extracto de levadura y glicerol); **GS**: método tinción de Gram; **SF**: método tinción de esporas Schaeffer-Fulton; **BF**: formas bacterianas (**B**: bacilo; **C**: coco; **F**: filamento); **Mo**: motilidad; **OxR**: relación oxígeno bacteriano (**Ae**: aerobio; **F**: 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 b-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 BBLTM 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 Análisis estadístico, tabla de correlación por pares de variables.

Variables	Pruebas bioquímicas y fisiológicas																											
	g.p	s.f	b	c	mo	cae	cana	cat	oxi	mc1	mc2	cit	rm	vp	ur	gel	ms1	ms2	dna	alm	c50oc	c65oc	laca	glua	susa	mala	glya	
g.p	1,0	0,4	-0,1	0,1	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	0,2	-0,7	-0,4	-0,7	-0,2	0,3	-0,1	0,2	0,2	0,2	-0,1	0,2	0,5	0,1	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	-0,4	
s.f		1,0	0,2	-0,2	0,1	0,1	0,0	-0,1	0,2	-0,4	-0,2	-0,3	0,0	0,2	-0,2	0,1	0,1	0,1	-0,1	0,2	0,2	0,1	-0,2	-0,2	0,0	-0,2	-0,2	
b			1,0	-0,8	0,9	0,4	-0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0	-0,2	0,3	0,0	-0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2	-0,1	0,1	-0,2	
c				1,0	-0,8	-0,2	0,1	-0,3	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	-0,3	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,1	-0,2	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,1	-0,1	0,1	
mo					1,0	0,4	-0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	-0,1	0,3	0,0	-0,1	0,1	0,1	-0,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	-0,2	
cae						1,0	-0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,1	-0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	
cana							1,0	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,1	-0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
cat								1,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	-0,1	-0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
oxi									1,0	-0,1	0,0	0,0	-0,2	0,2	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	0,2	-0,1	-0,2	0,1	0,1	-0,3	-0,1	-0,2	
mc1										1,0	0,8	0,6	0,2	-0,3	0,1	-0,2	-0,1	-0,1	0,0	-0,2	-0,4	-0,1	0,3	0,2	0,0	0,2	0,3	
mc2											1,0	0,5	0,1	-0,1	0,1	-0,2	0,1	0,0	0,0	-0,1	-0,2	0,0	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	
cit												1,0	0,2	-0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	-0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2	
rm													1,0	-0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,3	
vp														1,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0	0,1	0,3	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	-0,2	
ur															1,0	-0,1	0,1	0,1	0,3	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,1	0,2	
gel																1,0	0,2	0,2	0,0	0,2	0,0	-0,2	-0,1	-0,2	0,0	-0,2	0,2	
ms1																	1,0	0,9	0,1	0,2	0,1	-0,2	-0,1	0,0	0,1	0,2	-0,1	
ms2																		1,0	0,1	0,2	0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,0	0,0	-0,1	
dna																			1,0	0,2	-0,1	0,3	-0,2	-0,1	-0,1	0,1	0,2	
alm																				1,0	0,0	-0,1	-0,1	0,1	-0,1	0,1	-0,1	
c50oc																					1,0	0,4	-0,1	-0,1	0,2	0,0	-0,4	
c65oc																						1,0	-0,1	-0,2	0,0	0,0	-0,2	
laca																							1,0	0,3	0,1	0,2	0,1	
glua																								1,0	0,2	0,5	0,1	
susa																									1,0	0,3	0,0	
mala																										1,0	0,0	
glya																											1,0	

Anexo 5 Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de gases con sistema de detección de ionización en llama (GC-FID). A: Blanco del procedimiento, B: Patrón de gases, C: UC-13, D: UC-15, E: UC-14/15 F: UC-14/16.

