



ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA REHABILITACIÓN DE SUELOS MINEROS EN LA REGIÓN DEL CARIBE SECO COLOMBIANO: EXAMINANDO SISTEMAS PRODUCTIVOS CON ESPECIES AROMÁTICAS EN MICROCOSMOS.

Guía de técnicas para la identificación de bioindicadores de suelos específicos de minas de carbón

**Aslenis Melo
Darly Cañas Hoyos
Héctor A Rodríguez**

2022

Códigos:

El presente trabajo se llevó a cabo en el marco del proyecto de investigación “ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA REHABILITACIÓN DE SUELOS MINEROS EN LA REGIÓN DEL CARIBE SECO COLOMBIANO: EXAMINANDO SISTEMAS PRODUCTIVOS CON ESPECIES AROMÁTICAS EN MICROCOSMOS” Financiado con recursos provenientes **del PATRIMONIO AUTÓNOMO FONDO NACIONAL DEL FINANCIAMIENTO PARA LA CIENCIA, LA TECNOLOGÍA Y LA INNOVACIÓN FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS**, mediante la convocatoria 808 - 2018 (MINCIENCIAS - Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) - Universidad Popular del Cesar, CT 509-2019).

Investigación desarrollada por el Grupo de Investigación Parasitología Agroecología Milenio en conjunto con el Grupo de Optimización Agroindustrial de la Universidad Popular del Cesar y el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) bajo la línea Temática de: USO EFICIENTE DE LOS RECURSOS NATURALES.



Tabla de contenido

Introducción.....	4
1. Guía de protocolo de muestreo de microorganismos en suelos impactados por minería de carbón.....	5
Materiales:	5
Zona de muestreo.....	5
Muestreo en cada bloque.....	6
Codigos de muestreo.....	6
2. Guía para la extracción de ADN de microorganismos presentes en muestras de suelos mineros.	7
Materiales	7
Metodología	7
Resultados esperados.....	8
3. Guía del flujo bioinformático para el procesamiento de datos metagenómicos provenientes de muestras de suelos mineros.....	9
Datos	9
Preprocesamiento.....	9
Instalación de paquetes.....	10
Carga de paquetes.....	10
Filtrar y cortar	10
Aprendizaje de la tasa de error	11
Algoritmo de inferencia.....	11
Juntar las lecturas pareadas.....	11
Construcción de la table de secuencias	12
Eliminación de quimeras.....	12
Seguimiento de lecturas a través de la canalización.....	12
Asignación de taxonomía.....	12
Visualización de los resultados filogeneticos	12
Referencias	15

Introducción

La minería en el Caribe seco colombiano produce cerca del 90 % del carbón que se extrae en el país (Unidad de Planeación Minero Energética - UPME, 2016; Agencia Nacional de Minería, 2017). El impacto ambiental de esta explotación genera contaminación del aire, del agua y de los ecosistemas aledaños. Entre estos impactos se destaca la degradación del suelo (Singh & Singh, 2006; Maiti & Maiti, 2015; Campillo, et al., 2000). Díaz et al., (2013) determinaron que la calidad del suelo de minas carboníferas ubicadas en el departamento de Cesar presenta degradación física y baja fertilidad. La contaminación ambiental por metales pesados también representa una problemática en la minería de carbón (Ali et al., 2013). Los metales no son biodegradables y se acumulan, representando un riesgo ambiental y deteriorando la calidad del suelo (Bhattacharyya et al., 2008; Khan et al., 2010). La degradación y contaminación del suelo han impactado negativamente las poblaciones aledañas a las minas extinguiendo la vocación agropecuaria.

En este escenario socioeconómico y ambiental, al momento de producirse el cierre definitivo de una mina, el suelo está gravemente afectado y por ende las microeconomías locales se ven afectadas por la desaparición de su principal motor económico con el agravante del pasivo ambiental. El proyecto propone implementar estrategias biotecnológicas que contribuyan a la rehabilitación de suelos carboníferos mediante la adquisición de nuevas prácticas productivas usando la especie aromática *Cymbopogon citratus*. Esta especie no solo ha sido encontrada como remediadora en suelos con residuos tóxicos de cobre (Das & Maiti, 2009), pero también puede ayudar a recuperar la materia orgánica del suelo ya que crece rápidamente. Los indígenas Kankuamos han utilizado *C. citratus* por décadas para extraer aceites esenciales que comercializan como base para cosméticos. Cabe mencionar que, aunque *C. citratus* es una especie introducida está adaptada al clima y los suelos de la región.

Aunque ya existe evidencia sobre las funciones fitoremediadoras de *Cymbopogon citratus*, sus usos como base para cosméticos y agroinsumos, y su adaptación a los ambientes áridos, se requieren investigaciones profundas y locales para llegar a conclusiones confiables y hacer más eficiente la metodología de rehabilitación del suelo y la de extracción de aceites. Experimentos, han demostrado que el uso de enmiendas orgánicas en cultivos de especies aromáticas contribuyen al aumento de la productividad y mejoran la fertilidad del suelo (Sabir et al., 2015; Scotti et al., 2015).

La presente guía resume las técnicas de biología molecular para realizar el muestreo, extracción y análisis de suelos mineros impactados por la minería del carbón con el fin de identificar bioindicadores en los suelos asociados al impacto producido o al efecto de los tratamientos en la mejora del suelo.

1. Guía de protocolo de muestreo de microorganismos en suelos impactados por minería de carbón.

Materiales:

- Bolsas Ziploc
- Espátula para toma de suelo.
- GPS
- Flexómetro por 5 m para calcular el diámetro
- Tubos PVC para toma de muestras de 5 cm de diámetro.
- Gel azul refrigerados
- Nevera de Icopor
- Cinta de enmascarar para rotular las muestras
- Marcador Sharpie.

Zona de muestreo

De acuerdo a la experiencia recopilada, los botaderos inactivos generan unas montañas de escombros que mezclan una serie de desechos del proceso, lo que reduce la cantidad de microorganismo que puedan sobrevivir en dichas condiciones. Por tal motivo lo ideal es realizar el muestreo por bloques en 4 sitios dentro de la mina de la siguiente manera: 1) Botadero inactivo alto (BiT), 2) Botadero inactivo medio (BiM), 3) Botadero inactivo bajo, 3) El bosque nativo (Bosque, Control para futuros analisis) (Figura 1).

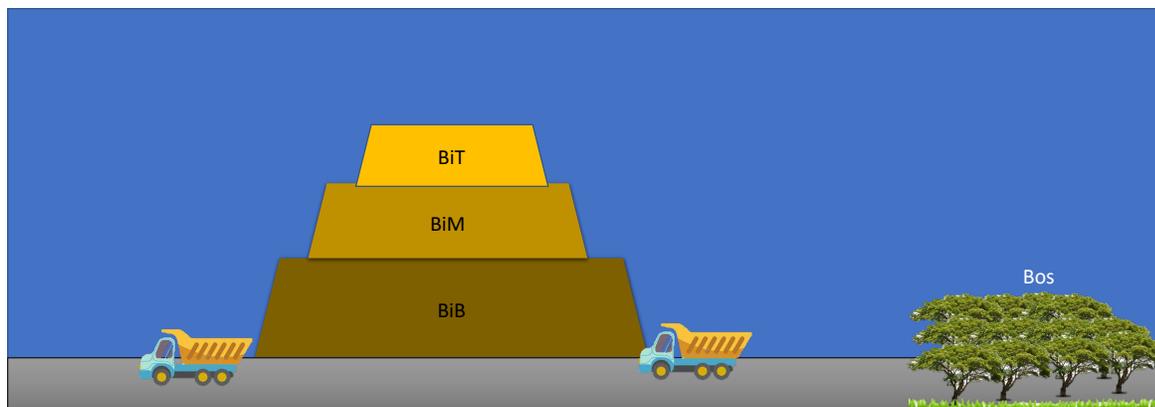


Figura 1. Sitios de muestreo recomendados en la zona de botadero inactivo.

Muestreo en cada bloque.

Una vez identificados cada uno de los sitios de muestreos cada uno de estos se tomara como un tratamiendo. En cada sitio de muestro se dibujará una parcela circular con centro en el punto, y diámetro de 10 m. Se muestrearán cinco puntos, los puntos cardinales N,S,E,O y el centro de la parcela con un tubo hasta 10 cm (2 pulgadas) de profundidad y 5 cm diámetro. De tal manera que de cada punto se recuperen al menos 200 gr de suelo. En total de cada cuadrante se deben obtener 1000 gr de muestra de suelo. A la final por cada sitio (por ejemplo BiM), se tendran 3 bolsas de 1000 gr.

Para la muestra se tomarán los primeros 10 cm de suelo o en caso de que el suelo tenga menos de 10 cm se tomará una muestra solo con el primer horizonte, teniendo mucho cuidado de no contaminar la muestra con el segundo horizonte del suelo. Para estar seguro sobre el cambio de horizonte se pondrá especial interés al cambio de color en los horizontes del suelo.

Es importante realizar la georeferenciación usando un GPS de cada uno de los puntos de muestreo para tener este registro en caso de realizar analisis en el tiempo.

Las muestras serán tomadas y almacenadas en nevera con pilas de gel refrigerante de tal manera que conserven sus condiciones hasta ser recibidas en el lugar de analisis.

Codigos de muestreo

BiT-Botadero inactivo top
BiM-Botadero inactivo Medio
BiB-Botadero inactivo bajo
Bosque- Bosque aledaño (Control)

Ejemplo:

BiT- R1 (coordenada de punto central)
BiT-R2 (coordenada de punto central)
BiT-R3 (coordenada de punto central)
BiM-R1
BiM-R2
BiM-R3
BiB-R1
BiB-R2
BiB-R3
Bosque-R1
Bosque-R2
Bosque-R3

Al final se deben almacenar 12 bolsas de 1 kg, para este diseño.

2. Guía para la extracción de ADN de microorganismos presentes en muestras de suelos mineros.

Esta guía se genera de la estandarización del proceso de extracción en muestras de ADN de microorganismos de suelos mineros, el proceso de extracción se presentó complejo en algunos casos debido a la condición físico-química de los suelos y de elevados contaminantes, por esto la optimización del protocolo permite mejores resultados.

Previamente, autoclavar las puntas para las pipetas de todos los tamaños, los tubos colectores de 2 ml y las espátulas para tomar la tierra.

Materiales

- Puntas para micropipetas de 20 ul, 200 ul, 1000 ul. (autoclavar previamente)
- Micropipetas de diferentes volúmenes 10 ul, 100 ul, 200 ul, 1000 ul.
- Tubos colectores de 2 ml.
- Tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Espátulas.
- Tamiz para filtrar tierra.
- Microcentrifuga.
- DNeasy PowerSoil Pro Kit.

Metodología

Nota. Idealmente preparar todos los materiales antes de sacar el suelo de la nevera para ser más rápido en el procedimiento, y pre enfriar la centrifuga a 10 °C.

1) las muestras deben ser tomadas y trasladadas al laboratorio manteniendo la refrigeración en todo momento, idealmente con geles azules y en nevera de icopor.

2) Una vez en el laboratorio el suelo será tamizado para homogenizar la muestra.

- 3) Adicionar 250 mg de muestra de suelo a el tubo PowerBead. Agitar por 3 min por Vortex para mezclar.
- 4) Adicionar 40 ul de la Solución C1 y mezclar por inversión varias veces o mezclar por vortex brevemente (30 segundos).
- 5) Dar vortex a los tubos de manera horizontal y mezclar por 10 minutos al máximo de velocidad.
- 6) Centrifugar los tubos a 10,000 g por 30 s.
- 7) Transferir el sobrenadante a un tubo colector nuevo de 2 ml.
- 8) Adicionar 250 ul de la solución C2 y de vortex por 5 S. Incubar en hielo a 4 °C por 10 minutos.
- 9) Centrifugar los tubos por 1 minuto a 10,000 g.
- 10) Transferir al menos 600 ul de sobrenadante a un tubo colector nuevo de 2 ml.
- 11) adicionar 200 ul de la solución C3 y de vortex brevemente. Y centrifugue los tubos por 2 minuto a 10,000 g.
- 12) transferir al menos 750 ul de sobrenadante a un tubo colector de 2 ml. Mezcle la solución C4 y agregue 1200 ul al sobrenadante. Mezclar por vortex por 5 S.
- 13) Cargue 675 ul en la columna MB Spin y centrifugue a 10,000 g por 1 minuto. Descarte el liquido que pase a través de la columna.
- 14) Repetir el paso 13 dos veces mas hasta que haya procesado toda la muestra.
- 15) Adicionar 500 ul de la solución C5. Centrifugue por 30 S a 10,000 g. Descarte el liquido que pase a través de la columna.
- 16) cambie el tubo colector de la columna por un tubo colector de 2 ml. Adicione 100 ul de la solución C6 en el centro de la membrana.
- 17) Centrifugue por 30s a 10,000 g. El DNA esta en el nuevo tubo colector, márkelo y almacénelo a -20 °C para los pasos posteriores.

Resultados esperados.

Los resultados que se esperan son de una concentración por encima de los 100 ng/ul. Y con una calidad aceptable y suficiente para que las muestras puedan ser procesadas bien sea por PCR o secuenciamiento (Figura 2).

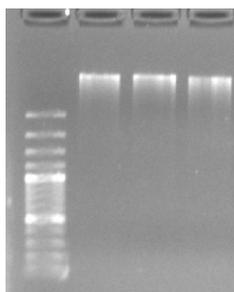


Figura 2. Resultado de muestras extraídas usando el protocolo estandarizado.

3. Guía del flujo bioinformático para el procesamiento de datos metagenómicos provenientes de muestras de suelos mineros.

Datos

El flujo se trabaja a partir de datos producto del secuenciamiento por Illumina Miseq, que genera lecturas pareadas de 250 pb. Se espera que entre 500.000 a 1.000.000 de lecturas por muestras sean suficientes para garantizar la profundidad del análisis. El flujo se optimizo con el manual para DADA2 (Callahan et al., 2016). Para el flujo en DADA2, se siguió el tutorial recomendado por el desarrollador con algunas modificaciones.

Preprocesamiento

Evaluación de la Calidad mediante programa FastQC (Brown et al., 2017):

```
> fastqc <soil_sample>_R1_001.fastq.gz  
> fastqc <soil_sample>_R2_001.fastq.gz
```

Para el pre-corte de las secuencias se utilizo el programa trimmomatic (Bolger et al., 2014), siguiendo la linea recomendada por los desarrolladores:

```
➤ java -jar trimmomatic-0.36.jar PE -phred33 input_forward.fq.gz input_reverse.fq.gz  
output_forward_paired.fq.gz output_forward_unpaired.fq.gz output_reverse_paired.fq.gz  
output_reverse_unpaired.fq.gz ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:25  
TRAILING:25 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:150
```

Instalación de paquetes.

```
➤ source("https://bioconductor.org/biocLite.R")  
➤ biocLite('dada2')  
➤ biocLite('phyloseq')  
➤ biocLite('DECIPHER')  
➤ install.packages('ggplot2')  
➤ install.packages('phangorn')  
➤ install.packages('MASS')
```

Carga de paquetes.

```
➤ library(dada2)  
➤ library(ggplot2)  
➤ library(phyloseq)  
➤ library(phangorn)  
➤ library(DECIPHER)  
➤ library(MASS)  
➤ packageVersion('dada2')
```

Carga de los datos a R, es importante descomprimir los archivos y que queden en formato fastq.

```
➤ path <- "~/Documents/MiSeq_SOP"  
➤ list.files(path)
```

Los archivos que se carguen deben tener el formato <muestra>_R1_001.fastq y <muestra>_R2_001.fastq

Filtrar y cortar

```
➤ fnFs <- sort(list.files(path, pattern="_R1_001.fastq", full.names = TRUE))
```

```
➤ fnRs <- sort(list.files(path, pattern="_R2_001.fastq", full.names = TRUE))
```

```
➤ sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_"), `[`, 1)
```

Visualización de los resultados

```
➤ plotQualityProfile(fnFs[1:2])  
➤ plotQualityProfile(fnRs[1:2])
```

Pasar los archivos filtrados a un subdirectorio

```
➤ filtFs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_F_filt.fastq.gz"))  
➤ filtRs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names, "_R_filt.fastq.gz"))  
➤ names(filtFs) <- sample.names  
➤ names(filtRs) <- sample.names
```

```
➤ out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs, truncLen=c(240,160),maxN=0,  
  maxEE=c(2,2), truncQ=2, rm.phix=TRUE, compress=TRUE, multithread=TRUE) # On  
  Windows set multithread=FALSE  
➤ head(out)
```

Aprendizaje de la tasa de error

```
➤ errF <- learnErrors(filtFs, multithread=TRUE)  
➤ errR <- learnErrors(filtRs, multithread=TRUE)  
➤ plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)
```

Algoritmo de inferencia

```
➤ dadaFs <- dada(filtFs, err=errF, multithread=TRUE)  
➤ dadaRs <- dada(filtRs, err=errR, multithread=TRUE)  
➤ dadaFs[[1]]
```

Juntar las lecturas pareadas

```
➤ mergers <- mergePairs(dadaFs, filtFs, dadaRs, filtRs, verbose=TRUE)  
➤ head(mergers[[1]])
```

Construcción de la table de secuencias

- `seqtab <- makeSequenceTable(mergers)`
- `dim(seqtab)`
- `table(nchar(getSequences(seqtab)))`

Eliminación de quimeras

- `seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, method="consensus", multithread=TRUE, verbose=TRUE)`
- `dim(seqtab.nochim)`
- `sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab)`

Seguimiento de lecturas a través de la canalización

- `getN <- function(x) sum(getUniques(x))`
- `track <- cbind(out, sapply(dadaFs, getN), sapply(dadaRs, getN), sapply(mergers, getN), rowSums(seqtab.nochim))`
- `# If processing a single sample, remove the sapply calls: e.g. replace sapply(dadaFs, getN) with getN(dadaFs)`
- `colnames(track) <- c("input", "filtered", "denoisedF", "denoisedR", "merged", "nonchim")`
- `rownames(track) <- sample.names`
- `head(track)`

Asignación de taxonomía

- `taxa <- assignTaxonomy(seqtab.nochim, "~/tax/silva_nr_v132_train_set.fa.gz", multithread=TRUE)`
- `taxa <- addSpecies(taxa, "~/tax/silva_species_assignment_v132.fa.gz")`
- `taxa.print <- taxa # Removing sequence rownames for display only`
- `rownames(taxa.print) <- NULL`
- `head(taxa.print)`

Visualización de los resultados filogenéticos

- `theme_set(theme_bw())`

- `samples.out <- rownames(seqtab)`
- `subject <- sapply(strsplit(samples.out, "S"), `[`, 1)`

- gender <- substr(subject,1,1)
- subject <- substr(subject,2,999)
- soil <- as.integer(sapply(strsplit(samples.out, "S"), `[`, 2))
- samdf <- data.frame(Subject=subject, Gender=gender, Soil=soil)
- samdf\$When <- "low"
- samdf\$When[samdf\$Soil>100] <- "high"
- rownames(samdf) <- samples.out

Preparación de table de OTUs

- ps <- phyloseq(otu_table(seqtab, taxa_are_rows=FALSE),
- sample_data(samdf),
- tax_table(tax))
- ps <- prune_samples(sample_names(ps) != "Mock", ps)

Identificación de ASV

- dna <- Biostrings::DNAStrngSet(taxa_names(ps))
- names(dna) <- taxa_names(ps)
- ps <- merge_phyloseq(ps, dna)
- taxa_names(ps) <- paste0("ASV", seq(ntaxa(ps)))
- ps

Generación de figuras

- plot_richness(ps, x="Gender", measures=c("Shannon", "Simpson"), color="Subject")
- plot_richness(ps)
- plot_richness(ps, measures=c("Simpson"))
- plot_richness(ps, x="Subject", measures=c("Chao1", "Simpson"))

- ps.prop <- transform_sample_counts(ps, function(otu) otu/sum(otu))
- ord.nmnds.bray <- ordinate(ps.prop, method="NMDS", distance="bray")
- plot_ordination(ps.prop, ord.nmnds.bray, color="Subject", title="Bray NMDS")

- GP.ord <- ordinate(ps, "NMDS", "bray")
- p1 = plot_ordination(ps, GP.ord, type="taxa", color="Phylum", title="taxa")
- print(p1)
- p1 + facet_wrap(~Phylum, 3)

```

➤ GP.ord <- ordinate(ps, "NMDS", "bray")
➤ p1 = plot_ordination(ps, GP.ord, type="taxa", color="Family", title="taxa")
➤ print(p1)
➤ p1 + facet_wrap(~Class, 3)

```

```

➤ p2 = plot_ordination(ps, GP.ord, type="samples", color="Subject")
➤ p2 + geom_polygon(aes(fill=Subject)) + geom_point(size=5) + ggtitle("samples")

```

```

➤ top20 <- names(sort(taxa_sums(ps), decreasing=TRUE))[1:20]
➤ ps.top20 <- transform_sample_counts(ps, function(OTU) OTU/sum(OTU))
➤ ps.top20 <- prune_taxa(top20, ps.top20)
➤ plot_bar(ps, x="Subject", fill="Genus") + facet_wrap(~When, scales="free_x")

```

```

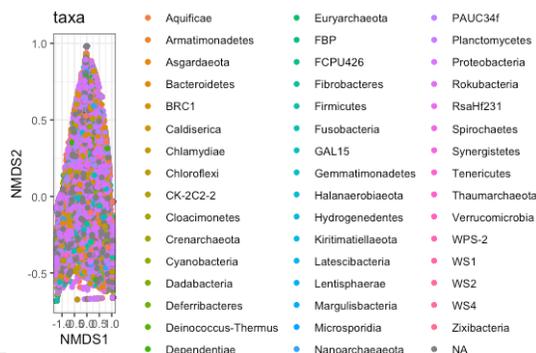
➤ plot_bar(ps.top20, fill = "Family")
➤ plot_bar(ps, fill = "Genus")

```

```

➤ gpt <- subset_taxa(ps, Kingdom=="k_Fungi")
➤ gpt <- subset_taxa(ps, Kingdom=="Bacteria")
➤ gpt <-

```



```

➤ prune_taxa(names(sort(taxa_sums(gpt), TRUE)[1:300]), gpt)
➤ plot_heatmap(gpt, sample.label="Subject")

```

Los resultados obtenidos por el flujo permiten alcanzar los resultados necesarios para realizar una buena discusión frente a la carga de microorganismos presentes en el suelo (figura 3).

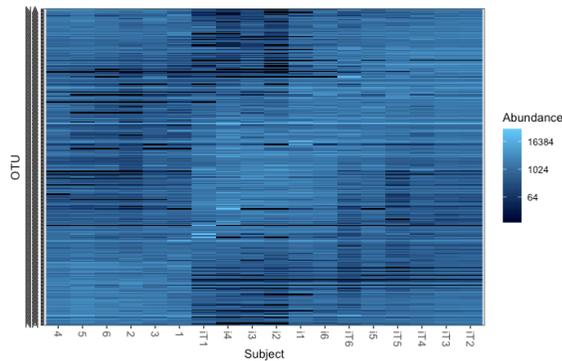


Figura 3. Resultados del flujo de análisis usando el programa DADA2.

Referencias

Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>

Bhattacharyya, P., Tripathy, S., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., & Banik, P. (2008). Fractionation and bioavailability of metals and their impacts on microbial properties in sewage irrigated soil. *Chemosphere*, 72(4), 543–550. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.03.035>

Bolger, AM., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.

Brown, J., Pirrung, M., McCue, LA. (2017) FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*. 1;33(19):3137-3139. doi: 10.1093/bioinformatics/btx373. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28605449; PMCID: PMC5870778.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581-583. doi: 10.1038/nmeth.3869.

Campillo, N., Martín, F., Simón, M., & Iriarte, A. (2000). CUANTIFICACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LOS SUELOS EN EXPLOTACIONES MINERAS A CIELO ABIERTO. *Edafología*, 7(3), 31–42.

Das, M., & Maiti, S. K. (2009). GROWTH OF *CYMBOPOGON CITRATUS* AND *VETIVERIA ZIZANIOIDES* ON Cu MINE TAILINGS AMENDED WITH CHICKEN MANURE AND MANURE-SOIL MIXTURES: A POT SCALE STUDY. *International Journal of Phytoremediation*, 11(8), 651–663. <https://doi.org/10.1080/15226510802568547>

Díaz, L. C., Arranz, J. C., & Mesa, G. (2013). Caracterización físico-química y mineralógica de suelos en zona carbonífera del Cesar Colombia. *Interciencia*, 38(1),

Khan, S., Hesham, A. E. L., Qiao, M., Rehman, S., & He, J. Z. (2010). Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2), 288–296. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0134-4>

Maiti, S. K., & Maiti, D. (2015). Ecological restoration of waste dumps by topsoil blanketing, coir-matting and seeding with grass-legume mixture. *Ecological Engineering*, 77, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.01.003>

Sabir, M., Zia-ur-Rehman, M., Hakeem, K. R., & Saifullah. (2015). Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils Using Organic Amendments: Prospects and Challenges. In *Soil Remediation and Plants* (Elsevier I, pp. 503–523). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-799937-1.00017-6>

Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., & Rao, M. A. (2015). Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 333–352.

Singh, A. N., & Singh, J. S. (2006). Experiments on Ecological Restoration of Coal Mine Spoil using Native Trees in a Dry Tropical Environment, India: A Synthesis. *New Forests*, 31(1), 25–39. <https://doi.org/10.1007/s11056-004-6795-4>

Unidad de Planeación Minero Energética - UPME. (2016). *Boletín Estadístico de Minas y energía 2012 – 2016. Ministerio de Minas y Energía*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Instituciones participantes



Instituciones colaborantes

