



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Biodiversidad microbiana de las aguas subterráneas y el efecto de la contaminación

Microbial biodiversity of groundwater and the effect of contamination

Trabajo de Fin de Grado

Carlos Gárate Dorta

Tutorizado por Laila Moujir Moujir

Grado en Biología

Junio 2022

Índice

Resumen	1
Abstract	1
1.- Introducción	2
2.- Objetivos	4
3.- Características de los ecosistemas de aguas subterráneas	4
4.- Diversidad microbiana de las aguas subterráneas	5
5.- Diversidad de estrategias metabólicas y formas de detección	7
5.1.- Desnitrificadoras	7
5.2.- Metanógenas	8
5.3.- Reductores de sulfato	9
5.4.- Metanotrofas	10
6.- Contaminación y su efecto en la biodiversidad	11
6.1.- Hidrocarburos del petróleo	11
6.2.- Lixiviados de aguas residuales	13
6.3.- Metales radiactivos	13
6.4.- Pesticidas	14
7.- Microorganismos como bioindicadores y calidad microbiológica	15
8.- Panorama de las aguas subterráneas en Canarias	18
9.- Conclusiones	20
10.- Conclusions	21
11.- Bibliografía	22

Resumen

Los recursos hídricos subterráneos proveen casi la mitad del agua potable del planeta, siendo destinadas principalmente a consumo, agricultura, industria y actividades recreativas. La gestión de estas aguas no siempre se lleva a cabo de forma sostenible pues usualmente son contaminadas debido a la actividad del hombre, suponiendo un gran problema global por su impacto en la salud.

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el objeto de determinar las características físicas y geológicas de los acuíferos, así como para determinar la biodiversidad microbiana existente en ellos. Así mismo, se analiza el impacto que los principales contaminantes antrópicos ejercen sobre la microbiota de las aguas subterráneas y, cómo influyen en el crecimiento de algunos géneros microbianos. Se aborda el estudio de los microorganismos bioindicadores de la calidad del agua, herramienta útil para determinar la contaminación biológica de las aguas. Por último, se realiza una breve aproximación al panorama actual de los acuíferos en las Islas Canarias haciendo hincapié en el desconocimiento general que existe acerca de este tipo de recurso en el archipiélago.

Palabras clave: aguas subterráneas, microorganismos, biodiversidad microbiana, contaminación, calidad del agua

Abstract

Groundwater resources provide almost half of the planet's drinking water, which is mainly used for consumption, agriculture, industry and recreational activities. The management of these waters is not always carried out in a sustainable manner as they are usually polluted due to human activity, which is a major global problem due to its impact on health.

Numerous investigations have been carried out to determine the physical and geological characteristics of aquifers, as well as to determine the microbial biodiversity existing in them. Likewise, it is analyzed the impact of the main anthropic pollutants on groundwater microbiota and how they influence the growth of some microbial genera. It is discussed the study of microorganisms as bioindicators of water quality, a useful tool to determine the biological contamination of water. Finally, a brief approach to the current panorama of aquifers in the Canary Islands is made, emphasizing the general lack of knowledge about this type of resource in the archipelago.

Key words: groundwater, microorganisms, microbial biodiversity, contamination, water quality

1.- Introducción

Las aguas subterráneas son consideradas un importante compartimento del ciclo hidrológico. Alrededor del 30% de toda el agua dulce es agua subterránea terrestre, mientras que los sistemas lóticos (arroyos y ríos) y lénticos (lagos) del mundo sólo aportan el 0,3% (Danielopol *et al.* 2003). El gran volumen de agua presente en el subsuelo presenta flujos derivados de la entrada y salida de agua por distintas vías. A la entrada de agua en el subsuelo es conocida como recarga hidrológica de los acuíferos, la cual es muy variable desde el punto de vista geográfico y depende en gran medida del clima, la geología, el tipo de suelo, la vegetación y el uso del suelo, entre otros factores (Scanlon *et al.*, 2002; Barua *et al.*, 2020). La recarga de las aguas subterráneas se realiza principalmente a través de las precipitaciones, así como por la infiltración natural de las aguas superficiales o con la recarga artificial, en la que participa el ser humano con la introducción de aguas pretratadas de características similares a las existentes en el acuífero. La salida de las aguas subterráneas se realiza de forma natural fluyendo hacia las aguas superficiales (lagos o ríos) y a través de manantiales y humedales, o de forma artificial debido a la explotación humana de este recurso (Scanlon *et al.*, 2002; Barua *et al.*, 2020).

Actualmente existe una gran demanda de las aguas subterráneas estimándose que el 40% de las reservas se destinan a nivel industrial, el 38% para el riego y un tercio de los recursos para consumo humano a nivel mundial, mientras que en Europa se emplea hasta el 70% del recurso para uso humano (Hoekstra, 2015; Doveri *et al.*, 2016). Por ello, el mantener este recurso de manera sostenible, accesible y segura es considerado uno de los principales pilares del desarrollo humano (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

Actividades antrópicas como la industria, urbanización o el uso de tierras para la agricultura y ganadería, suponen una amenaza para la calidad microbiológica de estas aguas al producir contaminantes que cuando llegan a las aguas subterráneas producen desequilibrios en las comunidades microbianas o bien producen una acción directa sobre la salud humana (Ríos-Tobón *et al.*, 2017; Al-Hashimi *et al.*, 2021). Las aguas subterráneas son un recurso limitado y vulnerable, que debe ser valorado y gestionado correctamente, teniendo en cuenta que los efectos de la contaminación podrían tardar en apreciarse a veces varias décadas (Custodio, 2000) y que los procesos de renovación y

purificación de las aguas subterráneas contaminadas pueden llevar desde décadas hasta cientos de años (Tatti *et al.*, 2019).

Los microorganismos poseen la mayor diversidad de organismos vivos conocida, que se encuentran implicados en procesos de relevancia como la renovación de la materia y la energía, producción de alimentos y en la salud humana (Locey *et al.*, 2016). Aunque la presencia de los microorganismos es ubicua su distribución está limitada por factores, como la temperatura, el pH y la actividad del agua (Merino *et al.*, 2019). No obstante, la variación de estos factores es lo que permite encontrar microorganismos en hábitats tan dispares como las aguas termales, glaciares, la atmósfera y el subsuelo terrestre, siendo este último el menos estudiado.

Las investigaciones sobre las aguas subterráneas se han centrado históricamente en los suministros, haciendo poco hincapié en su calidad microbiológica. En el pasado, prevalecía la suposición de que gran parte de las bacterias que contaminaban las aguas superficiales podían ser absorbidas o retenidas por los suelos mediante filtración y dejar las aguas subterráneas libres de contaminación. Esta perspectiva ha ido cambiando con el paso de los años y la aparición de distintas investigaciones que, como veremos en este trabajo, contemplan distintos tipos de contaminación de las aguas subterráneas y el efecto de estas en las comunidades microbianas. En la actualidad se considera que el subsuelo está ampliamente colonizado por bacterias, arqueas, protozoos y hongos (Engel, 2007) y que juegan un papel fundamental en distintos procesos biogeoquímicos de gran importancia (Yabusaki *et al.*, 2017).

A pesar de la reciente motivación por la hidrogeología y la microbiología de las aguas subterráneas, que es ampliamente utilizado en terrenos volcánicos (Segawa *et al.*, 2015), las Islas Canarias permanecen poco exploradas en este ámbito (Santamarta & Rodríguez, 2020). Además, la creciente demanda de los recursos hídricos en el archipiélago hace necesario la caracterización de los acuíferos existentes y que afectarían a la microbiota, aún desconocida siendo necesario estudios que aborden la situación actual de las aguas subterráneas en el archipiélago.

2.- Objetivos

De acuerdo con la importancia de las aguas subterráneas y la vulnerabilidad de estas a la contaminación, en este trabajo se lleva a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de:

- Evaluar la diversidad microbiana existente en los acuíferos.
- Establecer los principales tipos de contaminación de las aguas subterráneas y su efecto en estas.
- Exponer la situación actual de las aguas subterráneas y su papel en las Islas Canarias

3.- Características de los ecosistemas de aguas subterráneas

Las características típicas de las aguas subterráneas son su gran heterogeneidad química, geológica e hidrológica (Jankowski & Beck, 2000). Cada acuífero puede presentar una estratificación vertical única en cuanto a su geología y biología, aunque las condiciones ambientales de baja luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes, como el oxígeno y carbono orgánico, que, si bien son usualmente estables en cada estrato, son considerados por algunos autores como “condiciones extremas” para el desarrollo de la vida en estos ecosistemas (Merino *et al.*, 2019). Sin embargo, los microorganismos residentes en las aguas subterráneas se encuentran adaptados a estas condiciones, y por ello, las fuertes fluctuaciones ambientales suponen una mayor amenaza para su supervivencia (Onstott, 2003).

Recientemente se ha determinado que las aguas subterráneas se encuentran usualmente conectadas con otras por vías hidrológicas. Algunos autores, consideran esta situación como un continuo de ecosistemas, sugiriendo que deberían ser estudiados en su conjunto en lugar de individualmente, facilitando así la comprensión acerca de las dinámicas que tienen lugar en las aguas subterráneas y que afectan en gran medida a los microorganismos existentes (Barthel *et al.*, 2021).

Las zonas de transición, también conocidas como ecotonos, entre la zona saturada o acuífero y la zona vadosa, son consideradas como puntos de gran diversidad y actividad en las que se regula la transferencia de organismos, nutrientes, energía y materia particulada generando flujos entre una y otra zona (Herrero *et al.*, 2021). Las tasas de transferencia entre ambas varían lentamente, de manera que las tasas altas permiten

encontrar gran biodiversidad microbiana en los acuíferos, en contraste con las tasas bajas de transferencia, relacionadas con acuíferos de baja biodiversidad microbiana en los que se favorece la evolución alopátrica de los microorganismos (Onstott, 2003; Fillinger *et al.*, 2021).

4.- Diversidad microbiana de las aguas subterráneas.

Los ecosistemas de aguas subterráneas son reconocidos por carecer de unidades fotosintetizadoras, y aportes de carbono orgánico fácilmente disponible. Estos factores permiten realizar la diferenciación entre comunidades que habitan en las aguas subterráneas y las existentes en la superficie del suelo (Taubert *et al.*, 2019). Por ello, cabe esperar que aquellas comunidades microbianas heterótrofas que residan en los acuíferos posean características que les permitan adaptarse a los ambientes oligotróficos típicos de las aguas subterráneas (Taubert *et al.*, 2018; Nothaft *et al.*, 2021).

En estas condiciones también se pueden encontrar, aunque en menor abundancia que los heterótrofos, litoautótrofos, encargados de fijar el dióxido de carbono presente en el medio, y que obtienen la energía a través de la oxidación de donantes de electrones inorgánicos. Se consideran uno de los grupos de microorganismos más importantes en comunidades acuáticas subterráneas, al ser los principales productores de energía y nutrientes en el ecosistema. Estos microorganismos se encuentran principalmente asociados a la matriz sólida situada a gran profundidad en el subsuelo. Esta limitación en la ubicación de los litoautótrofos dificulta el flujo de nutrientes y energía al resto de organismos (arqueas, bacterias organotrofas, protozoos, microfauna y macrofauna), presentes en la masa de agua que forman el ecosistema. Las aguas subterráneas se caracterizan por tanto por sus complejas redes tróficas cuya finalidad es la distribución de nutrientes y energía con la mínima pérdida posible en el paso de un organismo a otro (Héry *et al.*, 2014; Karwautz *et al.*, 2022).

La identificación y caracterización de los microorganismos existentes en las aguas subterráneas han sido abordados empleando distintas metodologías. Inicialmente estaban basados en cultivos en medio enriquecidos y el Número más probable (NMP) y por ello la interpretación de los resultados se limitaban a estimaciones comparativas acerca del número de células y las actividades metabólicas de los microorganismos (Ghiorse & Wilson, 1988). Posteriormente, el empleo de técnicas con mayor capacidad de análisis como la clonación y la secuenciación de los ácidos nucleicos, permitió elaborar árboles

filogenéticos que facilitaron la comprensión de los microorganismos residentes en las aguas subterráneas y la expansión del conocimiento acerca de la diversidad de microorganismos en los acuíferos (Shi *et al.*, 1999).

Investigaciones llevadas a cabo con muestras de agua procedentes de distintas profundidades (entre 3 y 700 m), demostraron la presencia de bacterias Gram positivas, pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Streptococcus* y bacterias Gram negativas de los géneros *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Variovorax*. El género *Comamonas* fue el más abundante a una profundidad de 250 m, mientras que los otros géneros se encontraban a profundidades menores (entre 100 y 200 m), resultados que permitieron predecir que la presencia de los microorganismos estaba limitada a las condiciones existentes, hecho que por aquel entonces era desconocido (Balkwill *et al.*, 1997).

Estos resultados determinaron que las bacterias con ciclos de vida simple tendrían ventaja frente a microorganismos formadores de esporas, quistes o filamentosos pues, mientras que estos se encontraban limitados a los primeros metros de profundidad de la capa freática, aquellos con ciclos simples eran más abundantes y ampliamente distribuidos en las aguas. Además, se determinó que los microorganismos que habitaban las aguas subterráneas están fuertemente emparentados con aquellos que habitan en la superficie del suelo, aunque se tratasen de organismos distintos (Balkwill *et al.*, 1997).

Enfoques estadísticos como la estimación paramétrica y no paramétrica, así como la filogenética de comunidades en combinación con técnicas de biología molecular permitieron estimar y comparar de forma rigurosa la diversidad microbiana en diferentes ambientes, pudiendo realizarse modelos simples sobre la diversidad microbiana de acuíferos no estudiados, además de aumentar la diversidad tanto en taxones microbianos como funcionalmente (Bohannon & Hughes, 2003).

En la última década mediante el análisis metagenómico y metataxonómico, se ha señalado a las *Proteobacterias* o *Firmicutes* como los filos más abundantes en las aguas subterráneas, aunque también están presentes filos como *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Ignavibacteriae*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Armatimonadetes* y *Thermotogae* (Kadnikov *et al.*, 2020) Además, estos estudios han establecido que las diferencias en la abundancia de los distintos filos podrían deberse al

material geológico del acuífero (Momper *et al.*, 2017) o a las tasas de recargas de este (Yan *et al.*, 2021).

Recientemente, a las bacterias previamente caracterizadas como residentes en los acuíferos se sumaron otras especies de bacterias Gram negativas de los géneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Moraxella* y *Vibrio*, así como bacterias Gram positivas de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Estas bacterias fueron definidas como contaminantes al comprobarse que su hábitat de origen no estaba relacionado con las aguas subterráneas, sino que procedían de fuentes de contaminación con aguas residuales o hidrocarburos (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

5.- Diversidad de estrategias metabólicas y formas de detección

La descripción de la diversidad microbiana en muestras ambientales basadas en marcadores ribosómicos tiene un valor limitado cuando se van a investigar distintos grupos funcionales de microorganismos (Janda *et al.*, 2007; Vos *et al.*, 2012).

- Cuando los miembros de un clado se encuentran distribuidos en distintos filos.
- Cuando los parientes cercanos no comparten la misma fisiología de interés.
- Cuando no es posible realizar una asociación funcional de las secuencias relacionadas con su función debido a la falta de parientes cultivados.

Por ello, estos análisis son complementados o sustituidos por técnicas basadas en la detección de genes, definidos como marcadores funcionales, que codifican partes de enzimas conservadas y que son claves en las vías catabólicas del grupo a identificar. A continuación, se resumen los principales grupos funcionales encontrados en aguas subterráneas y sus métodos de identificación.

5.1.- Desnitrificadoras

Las desnitrificantes son un grupo filogenéticamente dispar y, por ende, la identificación de este grupo de microorganismos tiene gran dificultad al utilizar marcadores ribosómicos. Por ello, se han desarrollado y refinado distintas técnicas que permiten la identificación de este tipo de microorganismos al estar dirigidas a genes que participan en enzimas clave en el proceso de desnitrificación (paso de NO_3^- a N_2) como las nitrito reductasas, codificadas por los genes *nirK*, *nirS* y *nosZ* utilizados ampliamente en el proceso de identificación (Bellini *et al.*, 2013; Wegner *et al.*, 2019) (Figura 1).

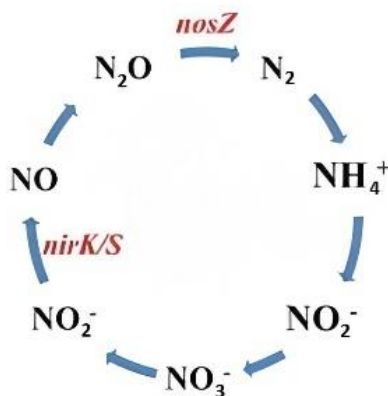


Figura 1. Presencia de los genes nirK, nirS y nosZ en la desnitrificación. Adaptado de Fang *et al.*, 2022.

El estudio basado en estos genes ha permitido la identificación de microorganismos en acuíferos salinos a pesar de existir multitud de posibles ensamblajes de las proteínas que codifican dichos genes (Santoro *et al.*, 2006) o detectar la posible contaminación con fuentes de nitrógeno en acuíferos situados de forma cercana a suelo agrícola (Bai *et al.*, 2020).

5.2.- Metanógenas

Es conocido que la función metanógena solo puede ser desempeñada por determinados grupos incluidos dentro de las arqueas. Estos microorganismos tienen gran importancia en acuíferos anaeróbicos o en zonas anaeróbicas en las que llevan a cabo la descomposición anaeróbica terminal de la materia orgánica en presencia de CO₂ (García *et al.*, 2000). El análisis filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S determinaron la presencia de arqueobacterias de los órdenes *Methanosarcinales* y *Methanomicrobiales* como los principales microorganismos con capacidad metanógena en las aguas subterráneas (Gründger, *et al.*, 2015). Posteriormente, se identificaron bacterias del género *Acidovorax* capaces de realizar la metanogénesis, por lo que se sugiere que no solo las arqueas poseen la capacidad metanógena y que, además, dicho metabolismo se puede llevar a cabo en condiciones aerobias (Wang *et al.*, 2021). Sin embargo, hoy en día se continúa considerando la metanogénesis como un proceso anaerobio estricto y exclusivo de las arqueobacterias.

Recientemente se han desarrollado otros marcadores específicos para la identificación de organismos metanógenos, basados en la determinación del gen *mcrA* que codifica para la subunidad alfa de la metil-coenzima M reductasa (Mcr) (Vigneron *et al.*, 2017; Ueno *et al.*, 2019). Esta enzima está presente en las arqueas y bacterias con

capacidad metanógena (Wang *et al.*, 2021), en ellas cataliza la reducción de la metil-coenzima M por la coenzima B dando lugar a la formación de metano y al heterodisulfuro de coenzima M y coenzima B (Figura 2).

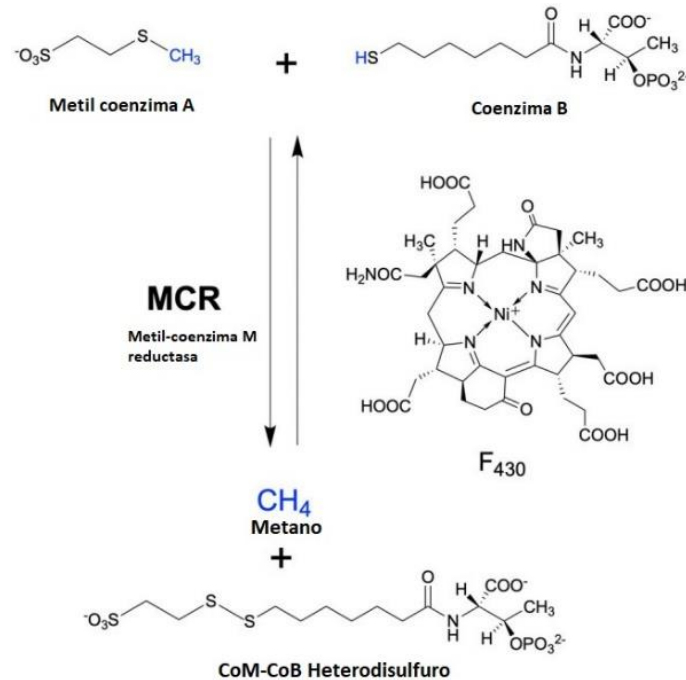


Figura 2. Presencia de la enzima MCR en la metanogénesis. Modificado de Gendron & Allen, 2022.

5.3.- Reductores de sulfato

Las bacterias sulfato reductoras son anaerobias estrictas, capaces de reducir el sulfato utilizando formas oxidadas de azufre como aceptores de electrones y dando sulfuros como producto final que será utilizado por las bacterias oxidadoras de sulfuro (Miao *et al.*, 2012). La presencia de enzimas específicas para este tipo de organismos permite llevar a cabo la detección de genes que codifican dichas enzimas utilizándose en este caso el gen *dsrB* que codifica para la subunidad beta de la sulfito reductasa (Figura 3).

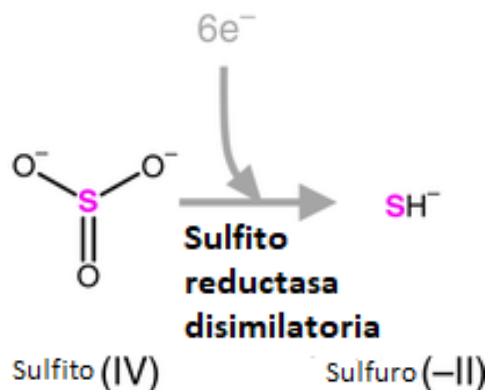


Figura 3. Presencia de la enzima sulfito reductasa en la reducción de sulfato. Modificado de Sim *et al.*, 2019.

Por otra parte, a diferencia de los microorganismos desnitrificantes, si es posible la detección de regiones en el ARNr 16S específicas para este tipo de microorganismos (Li *et al.*, 2014). El uso marcadores en el ARNr 16S ha permitido la detección de géneros como *Desulfobacter*, *Desulfovibrio* y *Desulfobulbus* (Kleikemper *et al.*, 2002), que están implicados en la degradación de contaminantes como residuos agroindustriales, hidrocarburos o metales (Bomberg *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2016) sugiriéndose que este tipo de bacterias podrían ser utilizadas en la biorremediación de contaminantes (Bomberg *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2016).

5.4.- Metanotrofas

Los microorganismos metanotrofos, son ubicuos y se localizan en la interfaz de ambientes aerobios y anaerobios donde hay metano, que utilizan como única fuente de carbono y energía. Juegan un importante papel en el ciclo del C, ya que transforman el metano procedente de la descomposición anaerobia en material celular y dióxido de carbono. Este grupo está ampliamente distribuido, formado por especies de los filos *Proteobacteria*, *Verrumicrobia* o *Archaea*, capaces de realizar la oxidación de metano de forma aerobia o anaerobia (Guerrero-Cruz *et al.*, 2021), lo cual ha incrementado el interés de las metanotrofas en biotecnología y biorremediación, para el control de este gas de efecto invernadero (Scholz *et al.*, 2020).

El primer paso de la oxidación de metano es realizado por la enzima metano monooxigenasa (MMO), que cataliza la hidroxilación de la molécula de metano a metanol, aumentando así su solubilidad. Esta enzima se puede encontrar en forma soluble (sMMO) o particulada (pMMO) la cual está asociada a la membrana y es la más ampliamente distribuida entre los microorganismos metanotrofos (Figura 4). Por ello, la detección de microorganismos con capacidad metanotrófica está basada en la presencia de los genes *mmo* y *pmo* codificantes de las enzimas sMMO y pMMO, respectivamente (Cheng *et al.*, 1999). Además, regiones del ARNr 16S pueden ser utilizadas para la identificación de estos microorganismos (Chen *et al.*, 2007).

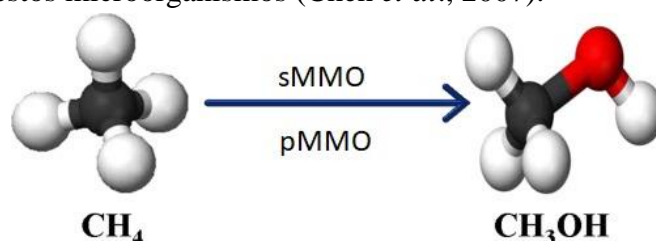


Figura 4. Presencia de las enzimas metano oxigenasas en la metanotrofia. Modificado de Han *et al.*, 2016.

6.- Contaminación y su efecto en la biodiversidad

Por lo general, se definen dos formas de contaminación de las aguas subterráneas. La contaminación puntual, que afecta a zonas localizadas y usualmente pequeñas en las que se puede determinar fácilmente la fuente de contaminación. Se da generalmente en la lixiviación de componentes derivados de la industria o residuos urbanos hacia las aguas subterráneas. Por otro lado, la contaminación difusa afecta a grandes áreas y es de gran dificultad la determinación de una fuente concreta de contaminante. Este proceso es debido generalmente a la agricultura donde la aplicación de productos fertilizantes y pesticidas, por su gran movilidad a través del aire y el suelo pueden afectar a grandes extensiones. Usualmente se considera que este tipo de contaminación de mayor peligrosidad y se requiere de métodos complejos de llevar a cabo y coste elevado para su eliminación (Galaviz & Villalobos, 2019).

Es sabido que determinados contaminantes pueden alterar las comunidades de microorganismos existentes en las aguas subterráneas produciendo cambios en la composición original de dichos acuíferos (Allen *et al.*, 2007). Pueden producir un aumento de la diversidad, atribuible a las altas concentraciones de microorganismos introducidos por el propio contaminante (Nikolova & Gutiérrez, 2020) o al incremento en la disponibilidad de nutrientes que forman parte del contaminante (Giagnoni *et al.*, 2020). Pero también, pueden ser responsables de la reducción de la diversidad por su efecto tóxico sobre los microorganismos (Hemme *et al.*, 2010).

A continuación, se detallan los principales contaminantes de origen antrópico que afectan a las aguas subterráneas y se evalúa su efecto específico sobre la biodiversidad y los principales métodos biológicos utilizados en la detección del contaminante.

6.1.- Hidrocarburos del petróleo

Las poblaciones microbianas son alteradas por la presencia de hidrocarburos, particularmente las que tienen la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono. (Kämpfer *et al.*, 1991), determinaron que cuando en las aguas subterráneas estaba presente este tipo de contaminante, se veían favorecidas las bacterias Gram positivas de los géneros *Arthrobacter*, *Nocardia* y *Bacillus* y bacterias Gram negativas de los géneros *Pseudomonas* y *Comamonas*. Este trabajo fue considerado el punto de inflexión que comenzaría a promover el estudio de los efectos de los hidrocarburos del petróleo en las

comunidades subterráneas, sugiriendo que aquellos microorganismos favorecidos por dichas condiciones, podrían ser degradadores de dicho contaminante.

Posteriormente, se aislaron e identificaron nuevos géneros, como *Methanosaeta*, y especies, como *Syntrophus gentianae*, de los que se desconocía hasta ese momento su presencia en las aguas subterráneas (Dojka *et al.*, 1998). Describiéndose a partir de entonces, microorganismos degradadores de componentes de los hidrocarburos del petróleo, como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Acenitobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Rhodotorula*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus* y *Sphingomonas* (Aitken *et al.*, 1998; Dean-Ross *et al.*, 2002; Gran-Scheuch *et al.*, 2017) o fúngicos como *Aspergillus*, *Achremonium*, *Fusarium*, *Phaenerochaete*, *Trichocladium* y *Verticillium* (Ghosal *et al.*, 2016).

Otros trabajos se centraron en estudiar los factores que afectaban a los cambios en las comunidades microbianas, siendo los principales:

- La propia fracción de hidrocarburo: En los hidrocarburos saturados, la longitud de la cadena está altamente correlacionada con la toxicidad sobre los microorganismos. Se ha demostrado los compuestos de menor peso molecular (C6 a C20) son más tóxicos, debido a su alta biodisponibilidad, mientras que los hidrocarburos saturados de gran tamaño (> C20) tienen un mayor potencial mutagénico. Por otro lado, el efecto de los hidrocarburos insaturados resultó impredecible, aunque se considera que puede estar influenciado por los grupos funcionales reactivos, la viscosidad o su solubilidad en agua y la membrana (Tang *et al.*, 2012; Khudur *et al.*, 2015).
- La concentración de nutrientes: Se demostró que suelos con mayor concentración de N y P aumentan la abundancia y la actividad de la comunidad microbiana que degrada los hidrocarburos, favoreciendo a este tipo de microorganismos sobre otros, desplazando la dinámica microbiana (Truskewycz *et al.*, 2019; Khudur *et al.*, 2015).
- Co-contaminación con otras sustancias químicas (por ejemplo, metales pesados): Se registró una mayor toxicidad sobre los microorganismos cuando estaban presentes junto a los hidrocarburos del petróleo, metales pesados como co-contaminantes (Thavamani *et al.*, 2012; Khudur *et al.*, 2015).

6.2.- Lixiviados de aguas residuales

Otras perturbaciones antropogénicas que pueden alterar gravemente la biodiversidad microbiana son los lixiviados de aguas residuales. A las aguas subterráneas llegan mezclas complejas de tóxicos y nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, y por ello, es complejo catalogar el efecto que tendrá este tipo de contaminación en las comunidades microbianas.

Inicialmente, se consideró que los lixiviados ejercían una influencia positiva sobre la diversidad microbiana, ya que se veían favorecidas las comunidades que eran capaces de degradar o convivir en presencia de grandes cantidades de fósforo, hierro o amonio existentes en las aguas residuales (Fatta *et al.*, 1999).

(Röling *et al.*, 2001) indicaron señalaron a las β -Proteobacterias *Gallionella* y *Azoarcus* como las dominantes en la comunidad y responsables de la degradación de los contaminantes en condiciones de oxidación del hierro y reducción de nitratos, reacciones que ocurren comúnmente acopladas en los acuíferos (Smith *et al.*, 2017). En posteriores investigaciones se han identificado a los géneros *Pseudomonas*, *Aquabacterium*, *Hydrogenophaga*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Lysobacter* y *Perluclidibaca* como muy abundantes en acuíferos contaminados con aguas residuales y los autores sugieren que algunos de ellos están involucrados en la bioatenuación de estos contaminantes (Wang *et al.*, 2022).

Estos resultados muestran la gran complejidad en la determinación de la evolución de las comunidades microbianas afectadas por este tipo de contaminantes, pues se han de tener en cuenta diversos factores como los componentes químicos principales y los de mayor toxicidad presentes en las aguas residuales. Además, si fuese posible, se debería tener en cuenta la composición de la comunidad microbiana previa al evento contaminador o las características geoquímicas del terreno para analizar si determinados microorganismos se vieron favorecidos por dicha contaminación o mantienen su abundancia previa al efecto contaminador.

6.3.- Metales radiactivos

Uno de los mayores contaminantes y primeros compuestos en ser identificados en este tipo de contaminación es el uranio, reconocido como un gran contaminante resultado de actividades mineras. Este metal se puede encontrar en cuatro estados de oxidación

siendo la contaminación con especies de U(VI) muy preocupante por su gran solubilidad y radiactividad, dado que el metal en este estado de oxidación es capaz de propagarse rápidamente en las aguas subterráneas (López-Fernández *et al.*, 2020).

Cabe indicar, que se ha detectado un incremento de microorganismos pertenecientes a la familia *Geobacteriaceae* (Holmes *et al.*, 2002) o *Desulfobacter*, *Desulfocapsa*, *Desulfuromonas*, *Pelobacter* y *Geobacter* (Vrionis *et al.*, 2005), que son capaces de reducir el U(VI) a U(IV) en presencia de otros aceptores de electrones metálicos pasando de esta forma el uranio a estado insoluble (Abdelouas *et al.*, 2000) e inmovilizando el elemento, y con ello la eliminación de la forma soluble que es de las más peligrosas en este tipo de contaminación.

Los microorganismos favorecidos por la presencia de este metal, como son sus degradadores, pueden variar en función de la concentración del metal aceptor de electrones. Así, por ejemplo, en ubicaciones con grandes concentraciones de hierro reducido, existe una mayor abundancia relativa de bacterias como *Desulfuromonas*, *Pelobacter* y *Geobacter*, llevando a cabo una degradación más eficiente del uranio. Sin embargo, en ambientes en los que el hierro reducido se encuentra en concentraciones muy bajas, predominan los géneros *Desulfobacter* y *Desulfocapsa* que utilizan los sulfuros como aceptores de electrones, y aunque degradan el uranio lo hacen de manera menos eficiente (Vrionis *et al.*, 2005; Yabusaki *et al.*, 2007).

6.4.- Pesticidas

El aporte de pesticidas y sus productos de degradación a las aguas subterráneas procede principalmente de fuentes agrícolas, al contrario que los compuestos mencionados anteriormente que proceden principalmente de fuentes puntuales. El creciente uso de estos compuestos y su alta toxicidad a bajas concentraciones hace necesario el estudio acerca del efecto de dichos compuestos en comunidades vulnerables, como son las aguas subterráneas.

En estudios realizados con pesticidas comunes como ácidos fenoxi (Mecoprop, Diclóprop y 2,4-D) y sus metabolitos se ha detectado un aumento significativo de bacterias del género *Pseudomonas*, además del aumento significativo de genes (*tfdA*, *tfdB* y *tfdC*) que codifican enzimas implicadas en la degradación de dichos pesticidas (De Liphay *et al.*, 2003). Sin embargo, otras investigaciones llevadas a cabo con los mismos

pesticidas y los metabolitos derivados implicaron a las bacterias desnitrificantes como responsables de su degradación y una disminución significativa de la biomasa microbiana y de su diversidad (Michel *et al.*, 2021).

Aunque en estos trabajos se haya determinado la peligrosidad a bajas concentraciones de los pesticidas ácidos fenoxi, estos son una pequeña parte del total de pesticidas utilizados en la agricultura. Por ello, varios autores señalan la necesidad de investigaciones que estudien la toxicidad de los pesticidas en función de su naturaleza química y las concentraciones en las que estos contaminantes se encuentran en las aguas subterráneas (Michel *et al.*, 2021).

7.- Microorganismos como bioindicadores y calidad microbiológica

Como hemos indicado, el agua es uno de los recursos naturales más preciados, un elemento fundamental para el desarrollo de la vida. Puede ser utilizada en distintas actividades como el propio consumo, funciones en procesos industriales, uso en agricultura y ganadería o actividades recreativas entre otras (Scholz *et al.*, 2020).

Debido a su importancia para el ser humano y su vulnerabilidad a la contaminación, se hace necesario que esta no comprometa la salud del ser humano o la integridad del medio ambiente (Medema, 2012). Sin embargo, la determinación de la calidad microbiológica del agua y su contaminación, para cualquiera de sus usos, presenta varias dificultades como la diversidad existente de microorganismos, las técnicas utilizadas para llevar a cabo la identificación o el tiempo necesario para realizar los análisis y determinar su seguridad (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otros organismos han considerado como bioindicadores de calidad a los microorganismos fecales, los cuales, para ser considerados como tales, deben de cumplir los siguientes requisitos (WHO, 2017; Ríos-Tobón *et al.*, 2017):

- Ausentes en aguas no contaminadas y mantener una correlación proporcional de mayor abundancia respecto a los patógenos.
- Mayor tiempo de supervivencia en el agua que los patógenos.
- Igual o mayor resistencia a factores externos que los patógenos.
- No ser patógenos y no reproducirse en animales poiquiloterms.

- De fácil, rápido y económico aislamiento, cuantificación e identificación y si fuera posible presentar criterios microbiológicos comunes internacionalmente.
- Hallarse de forma constante en las heces y estar asociados a aguas residuales.
- Estar distribuidos al azar en las muestras.
- Ser resistentes a la inhibición de su crecimiento por otras especies.

Aunque principalmente se emplean microorganismos fecales, existen otros que pueden ser utilizados como bioindicadores, y que se asocian en su conjunto en tres grupos (Ríos-Tobón *et al.*, 2017), como se indica en las Figuras 5-7.

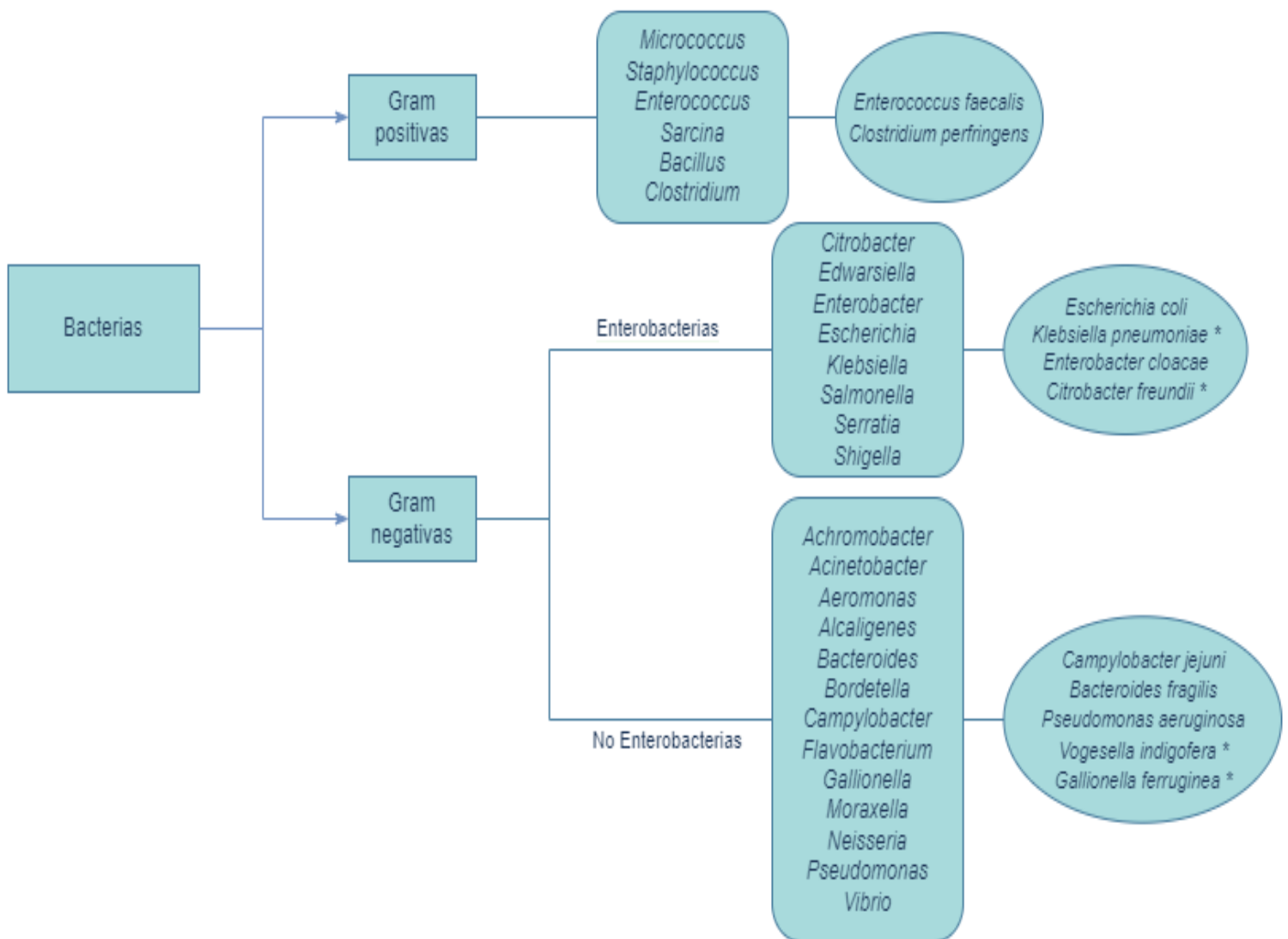


Figura 5. Grupos de bacterias utilizadas como bioindicadores y algunos ejemplos. Asterisco (*) indica origen no fecal. Adaptado de Ríos-Tobón *et al.*, 2017.

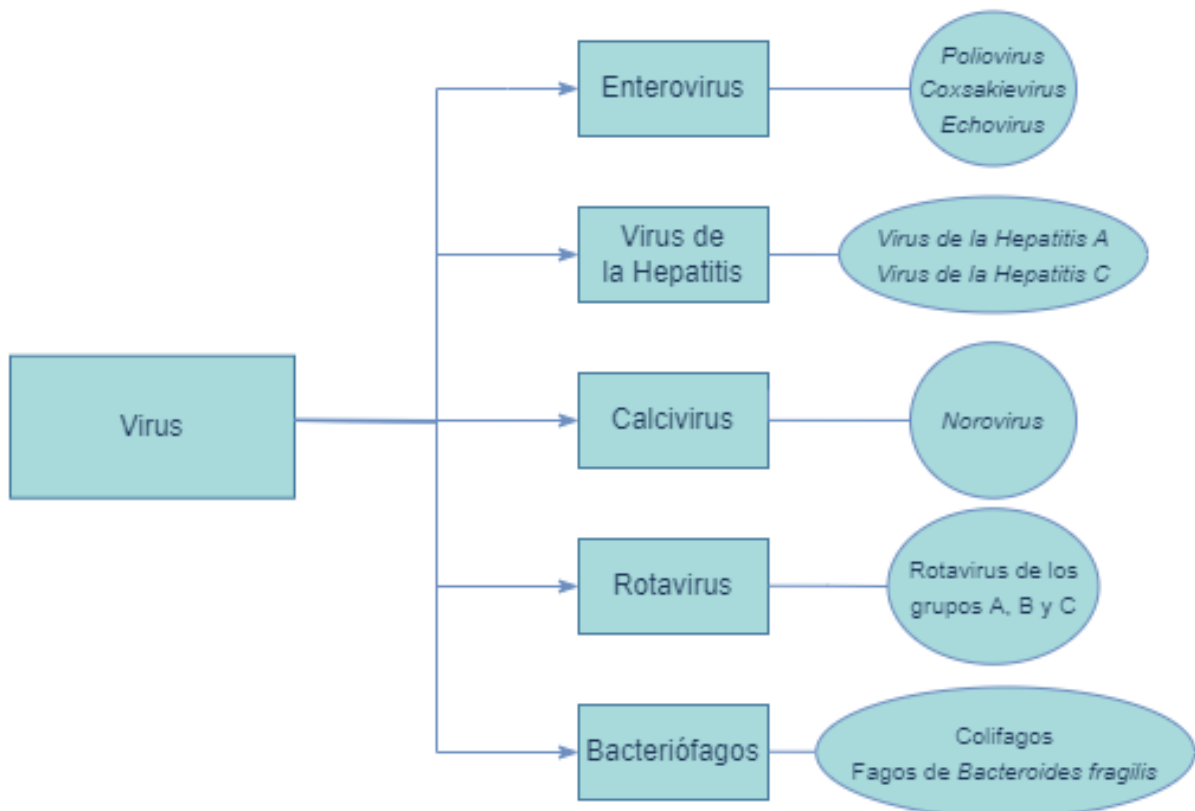


Figura 6. Grupos de virus utilizados como bioindicadores y algunos ejemplos. Adaptado de Ríos-Tobón *et al.*, 2017.

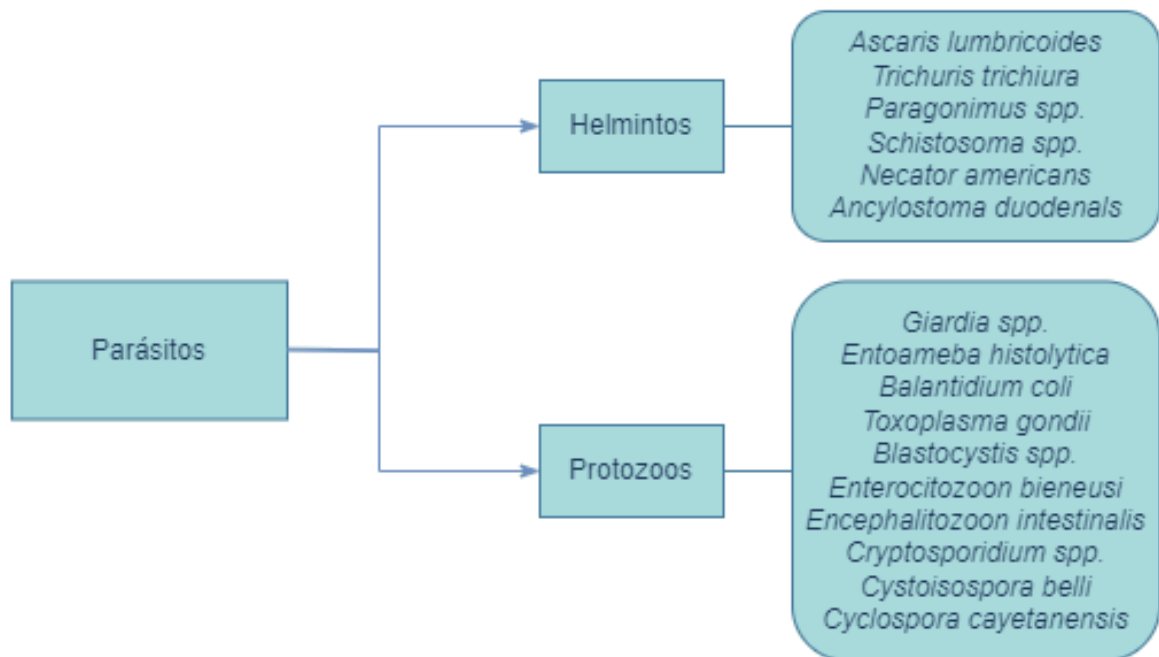


Figura 7. Grupos de parásitos utilizados como bioindicadores y algunos ejemplos. Adaptado de Ríos-Tobón *et al.*, 2017.

En las tablas 1 y 2 se indican los microorganismos que según las recomendaciones de la OMS se aplican en España como bioindicadores de la calidad del agua, los parámetros permitidos y la norma utilizada para cada tipo de análisis en función del uso previsto para el agua.

Tabla 1. Microorganismos indicadores en aguas de consumo humano (RD 902/2018).

Parámetro	Valor paramétrico	UNE-EN ISO
1. <i>Escherichia coli</i>	0 UFC en 100 ml	UNE-EN ISO 9308-1 UNE-EN ISO 9308-2
2. <i>Enterococos</i>	0 UFC en 100 ml	UNE-EN ISO 7899-2
3. <i>Clostridium perfringens</i> (incluidas las esporas) *	0 UFC en 100 ml	UNE-EN ISO 6222
4. Microorganismos cultivables a 22°C *		UNE-EN ISO 14189

* Cuando el resultado de la evaluación del riesgo lo aconseje a los parámetros del punto anterior se añadirán estos parámetros.

Tabla 2. Microorganismos indicadores en aguas de baño (RD 1341/2007).

		Calidad			UNE EN ISO
		Suficiente**	Buena*	Excelente*	
01	Enterococos intestinales (UFC/100mL)	330	400	200	7899-1 7899-2
02	<i>Escherichia coli</i> (UFC/100mL)	900	1.000	500	9308-1 9308-3

* Con arreglo a la evaluación del percentil 95. ** Con arreglo a la evaluación del percentil 90.

En la Directiva 2014/80/UE de la Comisión, RD 1075/2015 y su actualización en RD 47/2022 de 18 de enero, se regula la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro, y establece algunos parámetros de calidad de las aguas subterráneas. Los parámetros utilizados son principalmente químicos (nitratos, amonio, nitritos y fosfatos) y, algunos autores, sugieren complementar dichos parámetros con bioindicadores, lo que aumentaría la eficacia en la determinación de la contaminación de las aguas subterráneas.

8.- Panorama de las aguas subterráneas en Canarias

En las Islas Canarias debido a su origen volcánico y a las sucesivas erupciones, existe una gran heterogeneidad de materiales geológicos y una diversa orografía que podemos encontrar no solo en la misma isla, sino también entre ellas. Todas las islas del archipiélago albergan acuíferos de mayor o menor extensión bajo su superficie.

El abastecimiento de agua en las Islas Canarias varía de Oeste a Este. Mientras que en las islas occidentales el agua proviene fundamentalmente de las aguas subterráneas, las islas orientales, con aguas subterráneas enormemente contaminadas

principalmente, por sales provenientes del agua de mar, se abastecen mediante la desalinización de agua de mar. Los distintos usos dados a las aguas subterráneas en Canarias provienen de la agricultura (51%), seguido del urbano (25%), el turístico (10%) y la industria (4%) (Santamarta & Rodríguez, 2020).

Podemos encontrar varios tipos de acuíferos según su ubicación (Santamarta & Rodríguez, 2020):

- Acuíferos basales, situados en capas profundas, formando grandes bolsas subterráneas, gracias a la impermeabilidad de las rocas plutónicas (Ilustración 1).
- Acuíferos costeros, situados como su nombre indica cerca de la costa de las islas, cerca de la superficie. Su composición geológica permeable y su proximidad al océano hace que se puedan desarrollar contaminaciones por cloruros provenientes de la intrusión de aguas saladas (Ilustración 2).
- Acuíferos colgados, pequeñas masas de agua situada cerca de la superficie separada del acuífero basal por una zona impermeable (Ilustración 1).

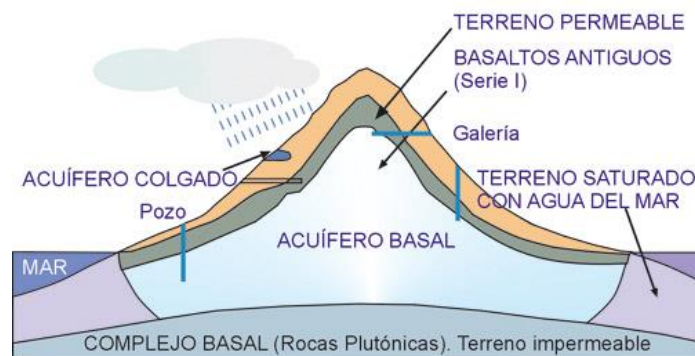


Ilustración 1. Ilustración donde se muestra las posiciones del acuífero colgado y del acuífero basal. Extraído del GEVIC.

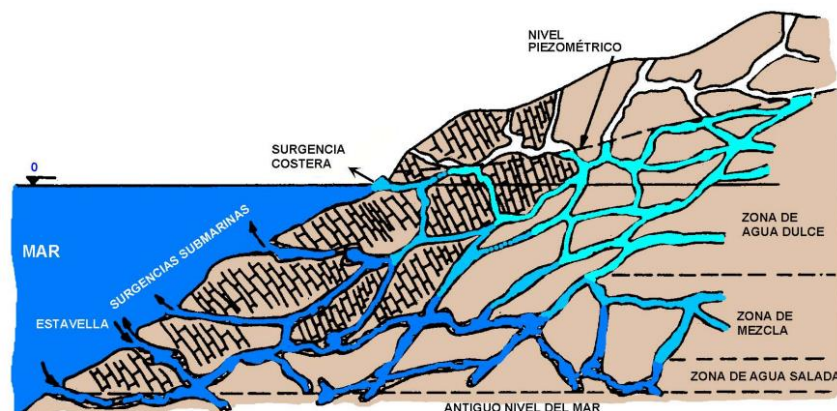


Ilustración 2. Ilustración donde se muestra la posición del acuífero costero. Extraído de Fernández et al., 2003.

En las Islas Canarias se encuentran, por su situación, diversos problemas que amenazan la calidad de las aguas subterráneas. Las principales fuentes de contaminación se encuentran en (Santamarta & Rodríguez, 2020):

- Contaminación por intrusión marina que introduce cloruros en el acuífero, principalmente en acuíferos cercanos al mar o en zonas de extracción de agua salada.
- Contaminación por malas prácticas agrícolas (nitratos) y pesticidas.
- Contaminación volcánica residual (bicarbonatos, sodio y flúor).
- Contaminación por lixiviados de aguas residuales, especialmente urbanas.

Las consecuencias de estas fuentes de contaminación se encuentran sin estudiar en las Islas Canarias. Si bien, conocemos que la contaminación altera las propiedades físico-químicas del agua subterránea se desconoce totalmente el efecto que estos contaminantes ejercen sobre la microbiota residente en los acuíferos. Además, se generaría un grave problema en la mayoría de las islas pues estas aguas suponen un elevado porcentaje que ayudan a cubrir las diferentes demandas. Así, debido a la escasez de recursos hídricos en Canarias y la problemática derivada de la contaminación de los acuíferos, se hace necesario el estudio, mantenimiento y aprovechamiento adecuado de este valioso recurso, protegiéndolo de contaminaciones químicas y biológicas.

Ante la situación actual de rápido desabastecimiento y cambio climático es necesaria la recarga artificial de acuíferos con aguas procedentes de la regeneración de aguas, situación aprovechable para llevar a cabo un exhaustivo estudio de la microbiota presente en las aguas siendo útil el análisis de acuíferos conocidos como contaminados además de los acuíferos que permanecen en condiciones totalmente naturales (Santamarta & Rodríguez, 2020).

9.- Conclusiones

Las aguas subterráneas han sido señaladas como un recurso vital en el pasado, presente y futuro del desarrollo humano, pues gracias a estas, se sostienen actividades esenciales como la agricultura o la industria. Aunque actualmente se estén desarrollando en este contexto trabajos “iniciales” debido a la falta de conocimiento previo acerca de estos ambientes, se han demostrado que en el subsuelo se encuentra una gran biodiversidad sensible a los procesos antrópicos que tienen lugar en la superficie. Estos

trabajos todavía no han sido llevados a cabo en las Islas Canarias, aunque ya se han descrito las características químicas y geológicas de la mayoría de los acuíferos, a la espera de investigaciones biológicas.

Estos ecosistemas presentan grandes oportunidades que permitirían el uso de microorganismos típicos de aguas subterráneas en la biodegradación de contaminantes en ecosistemas superficiales o su uso como bioindicadores que permitan conocer fácilmente si determinadas aguas han sufrido contaminación. Para ello, es fundamental mejorar el conocimiento científico de los procesos globales de los ciclos biogeoquímicos.

Por último, es necesario la colaboración con agricultores, ganaderos, administradores de aguas subterráneas para desarrollar enfoques que permitan un uso sostenible de las aguas subterráneas.

10.- Conclusions

Groundwater has been pointed out as a vital resource in the past, present and future of human development, since thanks to groundwater, essential activities such as agriculture and industry are sustained. Although "initial" works are currently being developed in this context due to the lack of previous knowledge about these environments, it has been demonstrated that in the underground there is a great biodiversity sensitive to the anthropic processes that take place on the surface.

These ecosystems present great opportunities that would allow the use of microorganisms typical of groundwater in the biodegradation of pollutants in surface ecosystems or their use as bioindicators that would make it easy to know if certain waters have suffered contamination. To this end, it is essential to improve scientific knowledge of the global processes of biogeochemical cycles.

Finally, it is necessary the collaboration with farmers, livestock breeders and groundwater managers to develop approaches for sustainable groundwater use.

11.- Bibliografía

- Abdelouas, A., Lutze, W., Gong, W., Nuttall, E. H., Strietelmeier, B. A., & Travis, B. J. (2000). Biological reduction of uranium in groundwater and subsurface soil. *The Science of the total environment*, 250(1-3), 21–35. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00549-5](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00549-5)
- Aitken, M. D., Stringfellow, W. T., Nagel, R. D., Kazunga, C., & Chen, S. H. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian journal of microbiology*, 44(8), 743–752. <https://doi.org/10.1139/w98-065>
- Al-Hashimi, O., Hashim, K., Loffill, E., Marolt Čebašek, T., Nakouti, I., Faisal, A., & Al-Ansari, N. (2021). A Comprehensive Review for Groundwater Contamination and Remediation: Occurrence, Migration and Adsorption Modelling. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(19), 5913. <https://doi.org/10.3390/molecules26195913>
- Allen, J. P., Atekwana, E. A., Atekwana, E. A., Duris, J. W., Werkema, D. D., & Rossbach, S. (2007). The microbial community structure in petroleum-contaminated sediments corresponds to geophysical signatures. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 2860–2870. <https://doi.org/10.1128/AEM.01752-06>
- Bai, F., Qi, X., Li, P., Qiao, D., Wang, J., Du, Z., She, Y., et al. (2020). Depression of Groundwater Table and Reduced Nitrogen Application Jointly Regulate the Bacterial Composition of nirS-Type and nirK-Type Genes in Agricultural Soil. *Water*, 12(12). <http://doi.org/10.3390/w12123459>
- Balkwill, D. L., Reeves, R. H., Drake, G. R., Reeves, J. Y., Crocker, F. H., King, M. B., & Boone, D. R. (1997). Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS microbiology reviews*, 20(3-4), 201–216. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00309.x>
- Barthel, R., Stangefelt, M., Giese, M., Nygren, M., Seftigen, K., & Chen, D. (2021). Current understanding of groundwater recharge and groundwater drought in Sweden compared to countries with similar geology and climate. *Geografiska Annaler Series A: Physical Geography*, 103(4), 323-345. <https://doi.org/10.1080/04353676.2021.1969130>
- Barua, S., Cartwright, I., Dresel, P., & Daly, E. (2020). *Using multiple methods to understand groundwater recharge in a semi-arid area*. <https://doi.org/10.5194/hess-2020-143>
- Bellini, M. I., Gutiérrez, L., Tarlera, S., & Scavino, A. F. (2013). Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification. *Systematic and applied microbiology*, 36(7), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.07.001>
- Bohannan, B. J., & Hughes, J. (2003). New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 282–287. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00055-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00055-9)
- Bomberg, M., Nyyssönen, M., Pitkänen, P., Lehtinen, A., & Itävaara, M. (2015). Active Microbial Communities Inhabit Sulphate-Methane Interphase in Deep Bedrock Fracture Fluids in Olkiluoto, Finland. *BioMed research international*, 979530. <https://doi.org/10.1155/2015/979530>
- Chen, Y., Dumont, M. G., Cébron, A., & Murrell, J. C. (2007). Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environmental microbiology*, 9(11), 2855–2869. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01401.x>
- Cheng, Y. S., Halsey, J. L., Fode, K. A., Remsen, C. C., & Collins, M. L. (1999). Detection of methanotrophs in groundwater by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 648–651. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.648-651.1999>
- Custodio, E. (2000). Effects of groundwater development on the environment. *Boletín Geológico y Minero*, 111, 107–120. https://www.igme.es/Boletin/2000/111_6-2000/6-EFFECTS.pdf
- Danielopol, D., Griebler, C., Gunatilaka, A., & Notenboom, J. (2003). Present state and future prospects for groundwater ecosystems. *Environmental Conservation*, 30(2), 104-130. <https://doi.org/10.1017/S0376892903000109>

- De Liphay, J. R., Tuxen, N., Johnsen, K., Hansen, L. H., Albrechtsen, H. J., Bjerg, P. L., & Aamand, J. (2003). In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 461–467. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.461-467.2003>
- Dean-Ross, D., Moody, J., & Cerniglia, C. E. (2002). Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS microbiology ecology*, 41(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00960.x>
- Directiva 2014/80/UE de la Comisión, de 20 de junio de 2014 , que modifica el anexo II de la Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro Texto pertinente a efectos del EEE. (2014). *Official Journal*, L 182, 52-55. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32014L0080>
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K., & Pace, N. R. (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3869–3877. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3869-3877.1998>
- Doveri, M., Menichini, M., & Scozzari, A. (2016). Protection of Groundwater Resources: Worldwide Regulations and Scientific Approaches. In A. Scozzari & E. Dotsika (Eds.), *Threats to the Quality of Groundwater Resources: Prevention and Control* (pp. 13–30). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-2015-421>
- Engel, A. (2007) Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 187–206. <https://caves.org/pub/journal/PDF/v69/cave-69-01-fullr.pdf>
- Fang, W., Wang, Q., Li, Y., Hua, J., Jin, X., Yan, D., & Cao, A. (2022). Microbial regulation of nitrous oxide emissions from chloropicrin-fumigated soil amended with biochar. *Journal of hazardous materials*, 429, 128060. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128060>
- Fatta, D., Papadopoulos, A. & Loizidou, M. A study on the landfill leachate and its impact on the groundwater quality of the greater area. *Environmental Geochemistry and Health*, 21, 175–190 (1999). <https://doi.org/10.1023/A:1006613530137>
- Fernández, R., Baquero, J.C., Lorca, D. & Verdejo, J. (2003) Acuíferos kársticos costeros. Introducción a su conocimiento. CIAGC. <https://aguas.igme.es/igme/publica/tiac-02/%C3%81REA%20I-1.pdf>
- Fillinger, L., Hug, K., & Griebler, C. (2021). Aquifer recharge viewed through the lens of microbial community ecology: Initial disturbance response, and impacts of species sorting versus mass effects on microbial community assembly in groundwater during riverbank filtration. *Water research*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116631>
- Galaviz I., & Villalobos, C. (2019). *Fuentes difusas y puntuales de contaminación. Calidad de aguas superficiales y subterráneas*. <https://doi.org/10.26359/epomex0719>
- García, J. L., Patel, B. K., & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6(4), 205–226. <https://doi.org/10.1006/anae.2000.0345>
- Gendron, A., & Allen, K. D. (2022). Overview of Diverse Methyl/Alkyl-Coenzyme M Reductases and Considerations for Their Potential Heterologous Expression. *Frontiers in microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.867342>
- GEVIC. *Hidrografía de Canarias*. http://www.gevic.net/hidrografia_de_canarias
- Ghiorse, W. C., & Wilson, J. T. (1988). Microbial Ecology of the Terrestrial Subsurface. In *Advances in Applied Microbiology*, 33, 107–172. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70206-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70206-5)
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in microbiology*, 7, 1369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Giagnoni, L., dos Anjos Borges, L.G., Giongo, A., de Oliveira Silveira, A., Ardisson, A.N., Triplett, E.W., Mench, M. & Renella, G. (2020). Dolomite and Compost Amendments Enhance Cu

- Phytostabilization and Increase Microbiota of the Leachates from a Cu-Contaminated Soil. *Agronomy*, 10(5): 719. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050719>
- Gran-Scheuch, A., Fuentes, E., Bravo, D. M., Jiménez, J. C., & Pérez-Donoso, J. M. (2017). Isolation and Characterization of Phenanthrene Degrading Bacteria from Diesel Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Frontiers in microbiology*, 8, 1634. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01634>
- Gründger, F., Jiménez, N., Thielemann, T., Straaten, N., Lüders, T., Richnow, H. H., & Krüger, M. (2015). Microbial methane formation in deep aquifers of a coal-bearing sedimentary basin, Germany. *Frontiers in microbiology*, 6, 200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00200>
- Guerrero-Cruz, S., Vaksmaa, A., Horn, M. A., Niemann, H., Pijuan, M., & Ho, A. (2021). Methanotrophs: Discoveries, Environmental Relevance, and a Perspective on Current and Future Applications. *Frontiers in microbiology*, 12, 678057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678057>
- Han, B., Yang, Y., Xu, Y., Etim, U. J., Qiao, K., Xu, B., & Yan, Z. (2016). A review of the direct oxidation of methane to methanol. *Chinese Journal of Catalysis*, 37(8), 1206–1215. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(15\)61097-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(15)61097-X)
- Hemme, C. L., Deng, Y., Gentry, T. J., Fields, M. W., Wu, L., Barua, S., Barry, K., Tringe, S. G., Watson, D. B., He, Z., Hazen, T. C., Tiedje, J. M., Rubin, E. M., & Zhou, J. (2010). Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *The ISME journal*, 4(5), 660–672. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.154>
- Herrero, J., Puigserver, D., Nijenhuis, I., Kuntze, K., Parker, B. L., & Carmona, J. M. (2021). The role of ecotones in the dehalogenation of chloroethenes in alluvial fan aquifers. *Environmental science and pollution research international*, 28(21), 26871–26884. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12538-0>
- Héry, M., Volant, A., Garing, C., Luquot, L., Elbaz Poulichet, F., & Gouze, P. (2014). Diversity and geochemical structuring of bacterial communities along a salinity gradient in a carbonate aquifer subject to seawater intrusion. *FEMS microbiology ecology*, 90(3), 922–934. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12445>
- Hoekstra, A. Y. (2015). The water footprint: The relation between human consumption and water use. In M. Antonelli, & F. Greco (Eds.), *The water we eat: Combining virtual water and water footprints*. 35-48. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16393-2_3
- Holmes, D. E., Finneran, K. T., O'Neil, R. A., & Lovley, D. R. (2002). Enrichment of members of the family Geobacteraceae associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2300–2306. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2300-2306.2002>
- Hussain, A., Hasan, A., Javid, A., & Qazi, J. I. (2016). Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. *3 Biotech*, 6(2), 119. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0437-3>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jankowski, J., & Beck, P. (2000) Aquifer heterogeneity: Hydrogeological and hydrochemical properties of the Botany Sands aquifer and their impact on contaminant transport, *Australian Journal of Earth Sciences*, 47(1), 45-64. <https://doi.org/10.1046/j.1440-0952.2000.00768.x>
- Kadnikov, V. V., Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Karnachuk, O. V., & Ravin, N. V. (2020). Microbial Life in the Deep Subsurface Aquifer Illuminated by Metagenomics. *Frontiers in microbiology*, 11, 572252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572252>
- Kämpfer, P., Steiof, M., & Dott, W. (1991). Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microbial ecology*, 21(1), 227–251. <https://doi.org/10.1007/BF02539156>

- Karwautz, C., Zhou, Y., Kerros M. E., Weinbauer, M. & Griebler, C. (2022). Bottom-Up Control of the Groundwater Microbial Food-Web in an Alpine Aquifer. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.854228>
- Khudur, L. S., Shahsavari, E., Miranda, A. F., Morrison, P. D., Nugegoda, D., & Ball, A. S. (2015). Evaluating the efficacy of bioremediating a diesel-contaminated soil using ecotoxicological and bacterial community indices. *Environmental science and pollution research international*, 22(19), 14809–14819. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4624-2>
- Kleikemper, J., Schroth, M. H., Sigler, W. V., Schmucki, M., Bernasconi, S. M., & Zeyer, J. (2002). Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1516–1523. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1516-1523.2002>
- Li, P., Li, B., Webster, G., Wang, Y., Jiang, D., Dai, X., Jiang, Z., Dong, H., & Wang, Y. (2014). Abundance and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in High Arsenic Shallow Aquifers. *Geomicrobiology*. 31. 802-812. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.893181>
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5970–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- López-Fernández, M., Jroundi, F., Ruiz-Fresneda, M. A., & Merroun, M. L. (2020). Microbial interaction with and tolerance of radionuclides: underlying mechanisms and biotechnological applications. *Microbial biotechnology*, 14(3), 810–828. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13718>
- Medema, G. (2012). Microbial Risk Assessment of Pathogens in Water. In R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. 6605–6633. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0851-3_38
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in microbiology*, 10, 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Miao, Z., Brusseau, M. L., Carroll, K. C., Carreón-Díazconti, C., & Johnson, B. (2012). Sulfate reduction in groundwater: characterization and applications for remediation. *Environmental geochemistry and health*, 34(4), 539–550. <https://doi.org/10.1007/s10653-011-9423-1>
- Michel, C., Baran, N., André, L., Charron, M., & Joulian, C. (2021). Side Effects of Pesticides and Metabolites in Groundwater: Impact on Denitrification. *Frontiers in microbiology*, 12, 662727. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662727>
- Momper, L., Kiel Reese, B., Zinke, L., Wanger, G., Osburn, M. R., Moser, D., & Amend, J. P. (2017). Major phylum-level differences between porefluid and host rock bacterial communities in the terrestrial deep subsurface. *Environmental microbiology reports*, 9(5), 501–511. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12563>
- Nikolova, C., & Gutiérrez, T. (2020). Use of Microorganisms in the Recovery of Oil From Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 10, 2996. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02996>
- Nothaft, D. B., Templeton, A. S., Boyd, E. S., Matter, J. M., Stute, M., Paukert Vankeuren, A. N., & (2021). Aqueous geochemical and microbial variation across discrete depth intervals in a peridotite aquifer assessed using a packer system in the Samail Ophiolite, Oman. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 126. <https://doi.org/10.1029/2021JG006319>
- Onstott, T. (2003). Geochemical and Geological Significance of Subsurface Microbiology. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. 1453-1468. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env263>
- Real Decreto 1075/2015, de 27 de noviembre, por el que se modifica el anexo II del Real Decreto 1514/2009, de 2 de octubre, por el que se regula la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro. *Boletín Oficial del Estado*, 300, de 16 de diciembre de 2015. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2015/11/27/1075>

- Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de las aguas de baño. *Boletín Oficial del Estado*, 257, de 26 de octubre de 2007. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2007/10/11/1341/con>
- Real Decreto 47/2022, de 18 de enero, sobre protección de las aguas contra la contaminación difusa producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. *Boletín Oficial del Estado*, 17, de 20 de enero de 2022. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2022/01/18/47>
- Real Decreto 902/2018, de 20 de julio, por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, y las especificaciones de los métodos de análisis del Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano, y del Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. *Boletín Oficial del Estado*, 185, de 1 de agosto de 2018. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2018/07/20/902>
- Ríos Tobón, S., Agudelo Cadavid, R. M., & Gutiérrez Builes, L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional De Salud Pública*, 35(2), 236–247. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>
- Röling, W. F., van Breukelen, B. M., Braster, M., Lin, B., & van Verseveld, H. W. (2001). Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 4619–4629. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4619-4629.2001>
- Santamarta, J. C., & Rodríguez, J. (2020). *Los procesos de planificación hidrológica en la Península Ibérica e islas en un contexto de cambio climático*. Universidad de La Laguna (España). <https://doi.org/10.25145/b.Planificacionhidrologica.2020>
- Santoró, A. E., Boehm, A. B., & Francis, C. A. (2006). Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 2102–2109. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2102-2109.2006>
- Scanlon, B.R., Healy, R.W. & Cook, P.G. (2002). Choosing appropriate techniques for quantifying groundwater recharge. *Hydrogeology Journal*, 18–39. <https://doi.org/10.1007/s10040-001-0176-2>
- Scholz, V., Meckenstock, R.U., Nielsen, L.P & Risgaard-Petersen, N (2020). Cable bacteria reduce methane emissions from rice-vegetated soils. *Nat Commun*, 13, 1878. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15812-w>
- Segawa, T., Sugiyama, A., Kinoshita, T., Sohrin, R., Nakano, T., Nagaosa, K., Greenidge, D., & Kato, K. (2015). Microbes in Groundwater of a Volcanic Mountain, Mt. Fuji; 16S rDNA Phylogenetic Analysis as a Possible Indicator for the Transport Routes of Groundwater. *Geomicrobiology Journal*, 32(8), 677–688. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.991811>
- Shi, Y., Zwolinski, M. D., Schreiber, M. E., Bahr, J. M., Sewell, G. W., & Hickey, W. J. (1999). Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments. *Applied and environmental microbiology*, 65(5), 2143–2150. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2143-2150.1999>
- Sim, M.S., Ogata, H., Lubitz, W., Adkins, J.F., Sessions, A.L., Orphan, V.J., & McGlynn, S.E. (2019). Role of APS reductase in biogeochemical sulfur isotope fractionation. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07878-4>
- Smith, R., Kent, D., Repert, D., & Böhlke, J. (2017). Anoxic nitrate reduction coupled with iron oxidation and attenuation of dissolved arsenic and phosphate in a sand and gravel aquifer. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 196, 102-120. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.09.025>
- Tang, J., Lu, X., Sun, Q., & Zhu, W. (2012). Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 149, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.12.020>

- Tatti, F., Petrangeli, M., Torretta, V., Mancini, G., Boni, M. R. & Viotti, P. (2019). Experimental and numerical evaluation of Groundwater Circulation Wells as a remediation technology for persistent, low permeability contaminant source zones. *Journal of Contaminant Hydrology*, 222: 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2019.03.001>
- Taubert, M., Stähly, J., Kolb, S., & Küsel, K. (2019). Divergent microbial communities in groundwater and overlying soils exhibit functional redundancy for plant-polysaccharide degradation. *PLoS one*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212937>
- Taubert, M., Stöckel, S., Geesink, P., Girnus, S., Jehmlich, N., von Bergen, M., Rösch, P., Popp, J., & Küsel, K. (2018). Tracking active groundwater microbes with D₂ O labelling to understand their ecosystem function. *Environmental microbiology*, 20(1), 369–384. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14010>
- Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2012). Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *Journal of environmental management*, 99, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.12.030>
- Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A. S., & Shahsavari, E. (2019). Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems-Fate and Microbial Responses. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), 3400. <https://doi.org/10.3390/molecules24183400>
- Ueno, A., Tamazawa, S., Tamamura, S., Aramaki, N., Alam Badrul, A. K. M., Murakami, T., Yamaguchi S., Yamagishi J., Tamaki H., Mayumi D., Naganuma T., & Kaneko, K. (2019). Improvement of terrestrial groundwater sampling method affects microbial community analysis. *Geomicrobiology Journal*, 36(4), 303-316. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1534900>
- Vigneron, A., Bishop, A., Alsop, E. B., Hull, K., Rhodes, I., Hendricks, R., Head, I. M., & Tsesmetzis, N. (2017). Microbial and Isotopic Evidence for Methane Cycling in Hydrocarbon-Containing Groundwater from the Pennsylvania Region. *Frontiers in microbiology*, 8, 593. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00593>
- Vos, M., Quince, C., Pijl, A. S., de Hollander, M., & Kowalchuk, G. A. (2012). A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS one*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030600>
- Vrionis, H. A., Anderson, R. T., Ortiz-Bernad, I., O'Neill, K. R., Resch, C. T., Peacock, A. D., Dayvault, R., White, D. C., Long, P. E., & Lovley, D. R. (2005). Microbiological and geochemical heterogeneity in an in situ uranium bioremediation field site. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6308–6318. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6308-6318.2005>
- Wang, P., Dai, H., Sun, B., Che, C., & Zhu, R. (2022). Bacteria Community Vertical Distribution and Its Response Characteristics to Waste Degradation Degree in a Closed Landfill. *Applied Sciences*, 12(6). <http://doi.org/10.3390/app12062965>
- Wang, Q., Alowaifeer, A., Kerner, P., Balasubramanian, N., Patterson, A., Christian, W., Tarver, A., Dore, J. E., Hatzenpichler, R., Bothner, B., & McDermott, T. R. (2021). Aerobic bacterial methane synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.2019229118>
- Wegner, C.E., Gaspar, M., Geesink, P., Hermann, Marz, M., & Küsel, K. (2019). Biogeochemical Regimes in Shallow Aquifers Reflect the Metabolic Coupling of the Elements Nitrogen, Sulfur, and Carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(5). <https://doi.org/10.1128/AEM.02346-18>
- World Health Organization (WHO). (2017). Guidelines for Drinking-water Quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva, Suiza. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
- Yabusaki, S. B., Fang, Y., Long, P. E., Resch, C. T., Peacock, A. D., Komlos, J., Jaffe, P. R., Morrison, S. J., Dayvault, R. D., White, D. C., & Anderson, R. T. (2007). Uranium removal from groundwater via in situ biostimulation: Field-scale modeling of transport and biological processes. *Journal of contaminant hydrology*, 93(1-4), 216–235. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.02.005>

- Yabusaki, S. B., Wilkins, M. J., Fang, Y., Williams, K. H., Arora, B., Bargar, J., Beller, H. R., Bouskill, N. J., Brodie, E. L., Christensen, J. N., Conrad, M. E., Danczak, R. E., King, E., Soltanian, M. R., Spycher, N. F., Steefel, C. I., Tokunaga, T. K., Versteeg, R., Waichler, S. R., & Wainwright, H. M. (2017). Water Table Dynamics and Biogeochemical Cycling in a Shallow, Variably-Saturated Floodplain. *Environmental science & technology*, 51(6), 3307–3317. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04873>
- Yan, L., Hermans, S. M., Totsche, K. U., Lehmann, R., Herrmann, M., & Küsel, K. (2021). Groundwater bacterial communities evolve over time in response to recharge. *Water research*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117290>