



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Instituto de Estudios de Posgrado

Máster en Gestión Ambiental y Biodiversidad

Trabajo Fin de Máster

Global diagnosis of the Guadalquivir river using multidisciplinary techniques

Diagnóstico global del río Guadalquivir mediante técnicas multidisciplinares

Autora: Gema Lipei Arjona Delgado

Directores: José Ángel Siles López
José Alhama Carmona

Agradecimientos

El presente trabajo se ha desarrollado en el marco del proyecto GUADALTOX (PAIDI-2020, P20_00143), y ha contado con el soporte del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Especial mención a mis tutores, José Ángel Siles y José Alhama, por toda su ayuda y dedicación, y a mis compañeros de departamento (Marina, Ana María, Inma y Marisa) por acompañarme y prestarme su apoyo todo este tiempo.

Índice general

Resumen	1
Palabras clave	1
Abstract	2
Keywords	2
Agradecimientos	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Área de estudio	10
3.2. Caracterización fisicoquímica	11
3.2.1. <i>Índice de calidad del agua</i>	11
3.3. Análisis metagenómico	12
3.3.1. <i>Extracción de ADN</i>	12
3.3.2. <i>Evaluación de la concentración y calidad del ADN</i>	13
3.3.3. <i>Evaluación metagenómica</i>	14
3.3.4. <i>Análisis estadísticos</i>	14
3.4. Correlaciones entre las variables fisicoquímicas y biológicas	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Caracterización fisicoquímica	16
4.1.1. <i>Evaluación del pH, oxígeno disuelto y potencial redox</i>	16
4.1.2. <i>Determinación de la concentración de carbono disuelto y alcalinidad</i>	18
4.1.3. <i>Niveles de sólidos en suspensión y turbidez</i>	21
4.1.4. <i>Evaluación de iones, conductividad y dureza</i>	23

4.1.5. <i>Determinación de la concentración de metales</i>	26
4.1.6. <i>Evaluación de los niveles de pesticidas y trihalometanos</i>	29
4.1.7. <i>Determinación de los niveles de cloro residual libre</i>	30
4.1.8. <i>Determinación de la concentración de clorofila</i>	31
4.1.9. <i>Determinación de bacterias coliformes totales y de E. coli</i>	33
4.1.10. <i>Índice de calidad del agua</i>	35
4.2. Análisis metagenómico	36
4.2.1. <i>Identificaciones microbianas a nivel de filo</i>	36
4.2.2. <i>Identificación de microorganismos a nivel de familia</i>	38
4.3. Análisis de correlaciones de los datos fisicoquímicos y biológicos	43
5. CONCLUSIONES	45
6. BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	51

Índice de Figuras

Figura 1: Porcentajes correspondientes al volumen total de agua dulce en el planeta (UNESCO, 2006).	3
Figura 2: Puntos donde se tomaron muestras de agua a lo largo del río Guadalquivir.	10
Figura 3: Variación de pH, concentración de O ₂ disuelto (izquierda) y potencial redox (derecha) en el agua a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.	18
Figura 4: Concentración de las distintas formas de carbono a lo largo del cauce del río Guadalquivir y en su estuario.	19
Figura 5: Valores de alcalinidad total (mg CaCO ₃ /L).	20
Figura 6: Concentración de sólidos en suspensión, minerales (SSM) y volátiles (SSV), a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.	21
Figura 7: Relación entre los sólidos en suspensión totales y la turbidez.	22
Figura 8: Evolución de la turbidez a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.	23
Figura 9: Concentración de cationes y aniones a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.	24
Figura 10: Composición química del agua del mar (Lyman & Fleming, 1940).	25
Figura 11: Conductividad (izquierda) y dureza (derecha) del agua evaluados a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.	26
Figura 12: Concentraciones de metales (hierro, manganeso y cobre) en los distintos puntos del río Guadalquivir y de su estuario.	28
Figura 13: Desembocadura del río Guadaíra en el Guadalquivir y localización del punto de muestreo G16 (Google Maps).	29
Figura 14: Niveles de distintos tipos de clorofila evaluados a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.	32
Figura 15: Relación entre las concentraciones de carbono orgánico total, nitratos y de clorofila a.	32
Figura 16: Niveles de bacterias coliformes (izquierda), y específicamente de <i>E.coli</i> (derecha), determinados en agua a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.	34
Figura 17: Índice de calidad del agua a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.	35

Figura 18: Evolución de los cambios a nivel de filo en el microbioma de aguas recogidas a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.	36
Figura 19: Evolución de la abundancia de las distintas familias microbianas identificadas a lo largo del cauce del río Guadalquivir y en su estuario.	38
Figura 20: Diversidad bacteriana a nivel de familia evaluada a largo del curso del río Guadalquivir mediante el índice de Shannon-Wiener.	39
Figura 21: Análisis de componentes principales obtenido a partir de las identificaciones bacterianas a nivel de familia a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.	40
Figura 22: Abundancia relativa de las familias identificadas en aguas a lo largo del curso del río Guadalquivir y su estuario.	42
Figura 23: Análisis de correlaciones entre variables fisicoquímicas y biológicas determinadas en el río Guadalquivir.	43

Índice de Tablas

Tabla 1: Extracciones de agua en el Guadalquivir (CHG, 2014).	4
Tabla 2: Variables usadas para el cálculo del índice de calidad del agua, ICA (Piedrahita, 2018).	6
Tabla 3: Coordenadas de los puntos de muestreo.	11
Tabla 4: Peso de las diferentes variables del índice de calidad del agua (WRC, 2022).	12
Tabla 5: Clasificación del Índice de Calidad del Agua (WRC, 2022).	12
Tabla 6: Intervalos de alcalinidad y efectos en agua potable (Wurts, 2002).	20
Tabla 7: Concentración de amonio en los últimos puntos del río Guadalquivir y su estuario.	24
Tabla 8: Concentración de pesticidas detectados en el último transecto del río Guadalquivir.	29
Tabla 9: Niveles de E.coli permitidos según el tipo de agua (Rock & Rivera, 2014).	33
Tabla 10: Filos bacterianos que mostraron diferencias significativas de abundancia en los distintos sitios del río Guadalquivir respecto al punto inicial (G1).	37
Tabla 11: Variables fisicoquímicas y microbiológicas empleadas por diferentes Índices de calidad del agua (ICA) (Torres <i>et al.</i> , 2009).	51
Tabla 12: Pesos relativos asignados a las variables que conforman los ICA (Torres <i>et al.</i> , 2009).	52
Tabla 13: Calificaciones de la calidad del agua (Piedrahita, 2018).	53
Tabla 14: Familias con diferencias significativas de abundancia en los distintos sitios del río Guadalquivir respecto al punto inicial (G1).	56

Resumen

El río Guadalquivir constituye la principal cuenca hidrográfica de Andalucía, soportando el impacto de numerosas actividades socioeconómicas que sitúan al río Guadalquivir en una situación vulnerable comprometiendo su calidad ambiental y biodiversidad. Dado su gran valor biológico, económico y paisajístico, es de gran importancia gestionar adecuadamente este recurso hídrico. Para contribuir a llevar a cabo esta tarea, se ha realizado un diagnóstico global del río integrando metodologías de análisis fisicoquímicas y microbiológicas.

Los resultados obtenidos demuestran que el mejor índice de calidad del agua se encuentra en el nacimiento del Guadalquivir y va disminuyendo con el curso del río, debido tanto a la influencia de variables cuya concentración puede variar de manera natural (turbidez, aniones y cationes, etc.), como a aquellas relacionadas con actividades antrópicas (metales pesados, coliformes totales, ciertos pesticidas, etc.). Se han detectado picos altos de contaminantes y de otras variables que indican mala calidad del agua, que se relacionan con actividades de origen antrópico aportadas por afluentes del río principal, como en la desembocadura del río Guadaira (altos niveles de hierro y cobre) y del Genil (proliferación de bacterias coliformes, como *E.coli*), y en el último tramo del río (actividades agrarias). Asimismo, otra forma de evaluar la calidad del agua es el índice de biodiversidad y perfil microbiano, ambos resultados en consonancia con los obtenidos en los análisis fisicoquímicos y que han permitido obtener correlaciones de gran utilidad a la hora de profundizar en el estudio de un ecosistema tan complejo y relevante como el río Guadalquivir.

Palabras clave: Río Guadalquivir; Ecosistema acuático; Análisis fisicoquímico y microbiológico; Metagenómica; Índice de Calidad del Agua.

Abstract

The Guadalquivir river constitutes the main hydrographic basin of Andalusia, which supports the impact of numerous socioeconomic activities that place Guadalquivir river in a vulnerable situation that endanger its environmental quality and biodiversity. Given its high biological, economic and landscape value, it is of marked importance to manage this water resource properly. To contribute to perform such task, a global diagnosis of the river has been carried out by integrating physicochemical and microbiological analysis methodologies.

The results obtained show that the highest value of the water quality index is at the source of Guadalquivir river and decreases with the course of the river. The decrease in water quality index might be due to the influence of variables whose concentration can fluctuate naturally (turbidity, anions and cations, etc.), and those related to anthropogenic activities (heavy metals, total coliforms, certain pesticides, etc.). High peaks of pollutants and other variables that indicate poor water quality have been detected, which are related to anthropogenic activities from tributaries of the main river, such as at Guadaira (high levels of iron and copper) and Genil rivers (proliferation of coliform bacteria, such as *E.coli*), and in the final stretch of the river (agricultural activities). Likewise, another way of assessing water quality is the biodiversity index and the microbiological profile, both results are consistent with those obtained in the physicochemical analyses and which have allowed obtaining correlations that will be very useful when deepening in the study of an ecosystem as complex and relevant as the Guadalquivir river.

Keyword: Guadalquivir river; Aquatic ecosystem; Physicochemical and microbiological analysis; Metagenomic; Water quality index.

1. INTRODUCCIÓN

Aunque la superficie terrestre se compone por un 70% de agua, solo un 2,5% de ella es dulce y, de este pequeño porcentaje, la mayoría se encuentra retenida en casquetes glaciares. Como consecuencia, el porcentaje de agua dulce superficial fácilmente accesible se reduce a 0,4% (Figura 1) (Agudelo, 2005; UNESCO, 2006; Shiklomanov & Rodda, 2003).

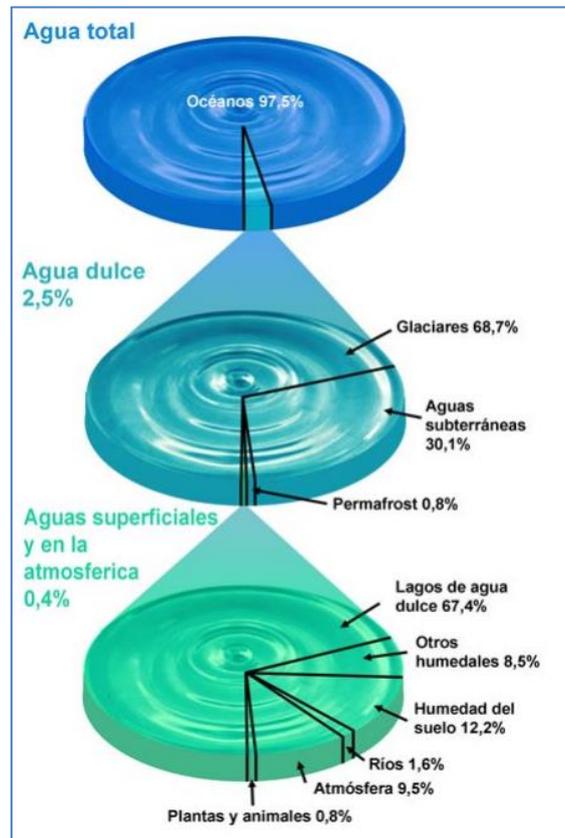


Figura 1: Distribución del agua dulce en el planeta (UNESCO, 2006).

En este contexto, en 2005 se consumieron al año 3.200.000 m³ de agua, si bien se estima que para 2030 se necesitarán más de 4.400.000 m³ anuales. De hecho, la competencia por este recurso entre la agricultura, ganadería, industria y abastecimiento de ciudades es una barrera limitante para el desarrollo económico en países en vías de desarrollo (Agudelo, 2005). Además, con frecuencia, a lo largo de los años, los ríos y arroyos se han ido contaminando con vertidos domésticos, industriales, ganaderos y agrícolas, principalmente en zonas cercanas a núcleos urbanos (Barceló & López de Alda, 2008). Por ejemplo, en su homónimo el río Guadalquivir boliviano, en la ciudad de Tarija el 40% de las descargas domésticas se vierten directamente al río sin pasar por un tratamiento previo, a lo que se suman vertidos industriales no controlados. Angulo (2015) diagnosticó el nivel de ecotoxicidad presente en el río usando

como bioindicadores semillas de *Lactuca sativa* (lechuga variedad White Boston) y bulbos de *Allium cepa* (cebolla amarilla). El estudio demostró que los niveles de toxicidad en el río oscilaban entre moderadamente tóxico hasta muy tóxico, destacando las altas concentraciones de fósforo y nitrógeno amoniacal en el agua.

A escala nacional, es destacable que España es uno de los países más áridos de la Unión Europea, de forma que la creciente demanda de agua y las sequías recurrentes conducen a episodios de escasez cíclica (MITECO, 2013). En Andalucía, el río Guadalquivir es fundamental para la agricultura que se desarrolla en torno a su cuenca. Si bien algunos cultivos como el olivo dependen principalmente de la lluvia, sin embargo, en el valle bajo hay cultivos que dependen fuertemente del riego (arroz, maíz, cítricos, algodón, etc.) (UCO & EVREN, 2015). En concreto, de acuerdo con la Confederación Hidrográfica del Guadalquivir (CHG), al año se extraen aproximadamente 3.800 hm³. La actividad que más presión ejerce en este consumo de agua es la agricultura, ya que supone el 88% de las extracciones, mientras la actividad urbana requiere aproximadamente un 10% (Tabla 1).

Tabla 1: Extracciones de agua en el Guadalquivir (CHG, 2014).

Sector	Consumo (hm³)
Urbano	379,5
Agrario	3.342,4
Industrial	43,4
Energía	35,8
Total	3.801,1

Lamentablemente, en los últimos años se ha producido una creciente presión sobre este recurso hídrico, debido al riego intensivo de los distintos cultivos, a lo que se une la contaminación que recibe de diversas fuentes, como: aguas residuales urbanas e industriales, nutrientes y pesticidas resultado de la actividad agrícola, etc., lo que deja la calidad del río Guadalquivir en una situación vulnerable (UCO & EVREN, 2015). La calidad del agua del río afecta a la ganadería y la pesca, con consecuencias también sobre la fauna y la flora.

Dado que el río Guadalquivir es una fuente de riqueza biológica, económica y paisajística, es de gran importancia gestionarlo adecuadamente, para lo que se requiere realizar un diagnóstico global de su estado (CHG, 2014; Greenpeace, 2005). La calidad del agua se puede evaluar determinando distintas variables fisicoquímicas, tales como: pH, DBO (Demanda Biológica de Oxígeno), DQO (Demanda Química de Oxígeno), COT (Carbono Orgánico Total), turbidez, temperatura, sólidos disueltos totales, conductividad, concentraciones de diferentes metales pesados, etc. Sin embargo, como no todas estas variables tienen la misma relevancia, se ha definido un indicador global que es capaz de evaluar la calidad de un ecosistema acuático mediante un único valor, al tener en cuenta de manera ponderada distintas variables fisicoquímicas y microbiológicas: el índice de calidad del agua (ICA) (Tyagi *et al.*, 2013).

El ICA puede calcularse teniendo en cuenta diferentes variables según el país. En España se incluyen las que propone la Unión Europea, estando conformado por 12 variables fisicoquímicas y microbiológicas (Tabla 11, ANEXO I) (Torres *et al.*, 2009).

$$ICA = \sum_{i=1}^n W_i * I_i$$

W_i: peso o porcentaje asignado a la i-ésima variable (Tabla 12, ANEXO I).

I_i: subíndice de la variable W_i.

Adicionalmente, Ramón Queralt, un científico enfocado a la investigación y gestión del agua, desarrolló en el año 1982 un índice para cuantificar la calidad de agua en las cuencas de Cataluña: el índice simplificado de calidad del agua (ISQA), que se basaba en 5 variables fisicoquímicas y que planteaba una clasificación de calidad del agua para seis usos del recurso, entre ellos el abastecimiento humano (Queralt, 2000; Torres *et al.*, 2009).

$$ISQA = T (COT + SS + OD + Cond)$$

T: Temperatura; **COT**: Carbono orgánico total (mg/l); **SS**: Sólidos suspendidos; **OD**: Oxígeno Disuelto; **Cond**: Conductividad. Previo al año 2003, el ISQA se calculaba utilizando DQO en vez de COT.

En el año 2018, Piedrahita realizó un análisis de la calidad del agua, en Quebrada Villa (Colombia), estimando el ICA a partir de 6 variables (Tabla 2). Usaron datos de estas variables recogidos a lo largo de 6 años y obtuvieron calificaciones de la calidad del agua aceptables, correspondientes a la segunda categoría dentro de las cinco posibles (Tabla 13, ANEXO I). Adicionalmente, llegaron a la conclusión de que el ICA es una variable que permite una fácil interpretación de los datos y comunicación de los resultados.

Tabla 2: Variables usadas para el cálculo del índice de calidad del agua, ICA (Piedrahita, 2018).

Variables	Wi (Peso relativo)
pH	0,15
Oxígeno disuelto (mg/L)	0,17
Conductividad (μ S/cm)	0,17
DQO (mg/L)	0,17
Relación NT/PT	0,17
Sólidos en suspensión totales (mg/L)	0,17

Los ecosistemas acuáticos están sometidos a cambios constantes, siendo las principales actividades que repercuten de forma severa en el medio las antrópicas, como la liberación de productos químicos persistentes, microplásticos, antibióticos, etc., (Michán *et al.*, 2021). Adicionalmente, no todos los efluentes que desembocan en el Guadalquivir pasan por estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). De hecho, en Andalucía el 13% de las aguas urbanas llegan a ríos o mares sin depurar, y el 65% de las depuradoras no superan los criterios de limpieza de aguas urbanas marcados por la ley. A esto hay que añadirle que las EDAR no poseen una eficiencia del 100% (CHG, 2022). Así, debido a la gran cantidad de sustancias químicas que se liberan a los ecosistemas acuáticos, se deben invertir muchos recursos para evaluar adecuadamente los riesgos medioambientales asociados a la contaminación, teniendo en cuenta además sus interacciones y efectos acumulativos.

Si bien la caracterización fisicoquímica es una aproximación válida para determinar la calidad de un cuerpo acuático, cada vez se da más relevancia a las comunidades microbianas, que poseen una estructura compleja y son imprescindibles para el correcto desarrollo de cualquier ecosistema (Segata *et al.*, 2013). Los microorganismos juegan un papel fundamental en los hábitats naturales, participan en procesos ecológicos que permiten el correcto funcionamiento de los ecosistemas, son los principales responsables de la descomposición de la materia y de múltiples ciclos de nutrientes, como: carbono, nitrógeno, azufre y fósforo, entre otros (Xue *et al.*, 2021). Algunas bacterias, como *Rhizobium* o *Frankia* participan en procesos de vital importancia como la fijación de nitrógeno en suelos. Sin la fracción microbiológica del suelo no sería posible la producción vegetal, ya que no solo participa en la nutrición vegetal, sino que también descompone restos orgánicos y los transforman de modo que son asimilables por las

plantas, ayudando así a la regeneración de suelos agrícolas... Otros microorganismos son utilizados incluso como sustituto a fitosanitarios para el control de plagas (Montaño *et al.*, 2010).

El análisis del microbioma del medio puede permitir un diagnóstico ambiental global al evaluar las perturbaciones que tienen las actividades antrópicas sobre el mismo (Michán *et al.*, 2021). En este contexto, en las últimas décadas se han desarrollado múltiples herramientas para estudiar las comunidades de microorganismos en ecosistemas naturales (suelo, sedimentos y agua), matrices complejas cuyo análisis no está exento de gran dificultad. La mayoría de los estudios microbianos emplean un enfoque metaómico, a distintos niveles (metagenómico, metaproteómico, metatranscriptómico y metabolómico), que permiten caracterizar de manera integral y precisa las comunidades microbianas y sus interacciones (Segata *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019). Las aproximaciones metaómicas tienen como objetivo identificar un panel de microorganismos, así como las funciones metabólicas que caracterizan a la comunidad microbiana que puebla una muestra no cultivada (Segata *et al.*, 2013).

Dentro del conjunto de técnicas, la metagenómica permite obtener las huellas genéticas (fragmentos de ARN y ADN) de una muestra determinada para posteriormente traducirlos a un lenguaje que se pueda leer (secuenciación) y así poder hacer una comparativa con todas las huellas genéticas almacenadas en bases de datos (P. ej.: GenBank) (Rubio-Guerri *et al.*, 2020). A nivel microbiano, la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) permite establecer relaciones filogenéticas de forma rápida y precisa entre organismos procariotas (Rodicio & Mendoza, 2004). El ARNr 16S se encuentra en todas las bacterias, ya que es importante para el ensamblaje del ribosoma. Además de regiones conservadas, que permiten usar cebadores específicos, posee regiones variables, que se pueden considerar como las huellas dactilares de los microorganismos y que permiten diferenciar las distintas especies de bacterias. Por todo ello, es un gen que se usa para identificar, comparar y clasificar a las comunidades microbianas a nivel filogenético (Salas *et al.*, 2022).

La evaluación metagenómica permite crear un perfil microbiano del ecosistema acuático, lo cual es muy útil para relacionar la presencia de determinados microorganismos con las características fisicoquímicas del curso de agua o con agresiones/estrés ambiental (P. ej.: la presencia de contaminantes, vertidos industriales, agrícolas y de la minería, fitosanitarios, aguas residuales...) (Wang *et al.*, 2020).

Los microorganismos pueden ser sensibles o mostrar tolerancia dependiendo de las características e intensidad de los factores bióticos o abióticos a que se enfrenten. Como seres vivos que son, los microorganismos tienen capacidad de adaptación, de forma que cuando su entorno se ve alterado, si no se trata de un cambio drástico, se pueden ir acondicionando a las nuevas condiciones. De hecho, un estudio realizado con las aguas del río Qiantang en Hangzhou, una de las ciudades más grandes de China, ha demostrado que la calidad del agua afecta significativamente a las comunidades microbianas. Así, la contaminación o las perturbaciones en el agua provocan una respuesta de resistencia y/o resiliencia por parte de estas comunidades, la cual podría utilizarse para predecir la calidad del agua o sus niveles de contaminación con una tasa de éxito aproximado de 89% (Wang *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales del presente Trabajo Fin de Máster son: Por un lado, determinar la calidad del agua del río Guadalquivir, desde su nacimiento hasta la desembocadura, mediante el análisis de diferentes variables fisicoquímicas y, por otro lado, crear un perfil microbiano del ecosistema acuático estudiado. Además, se evaluará la posible correlación entre ambos tipos de análisis y se identificarán los principales puntos críticos, en términos de calidad del agua, a lo largo del curso de río. Todo ello podría servir de base para la posible propuesta de medidas correctoras específicas para una adecuada gestión de este importante ecosistema acuático.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

Se realizaron muestreos de agua en 20 puntos (G1–G20) a lo largo del cauce principal del río Guadalquivir, que abarcaban desde el nacimiento hasta su desembocadura en el estuario. La Figura 2 muestra la localización de los lugares en los que se tomaron las muestras.

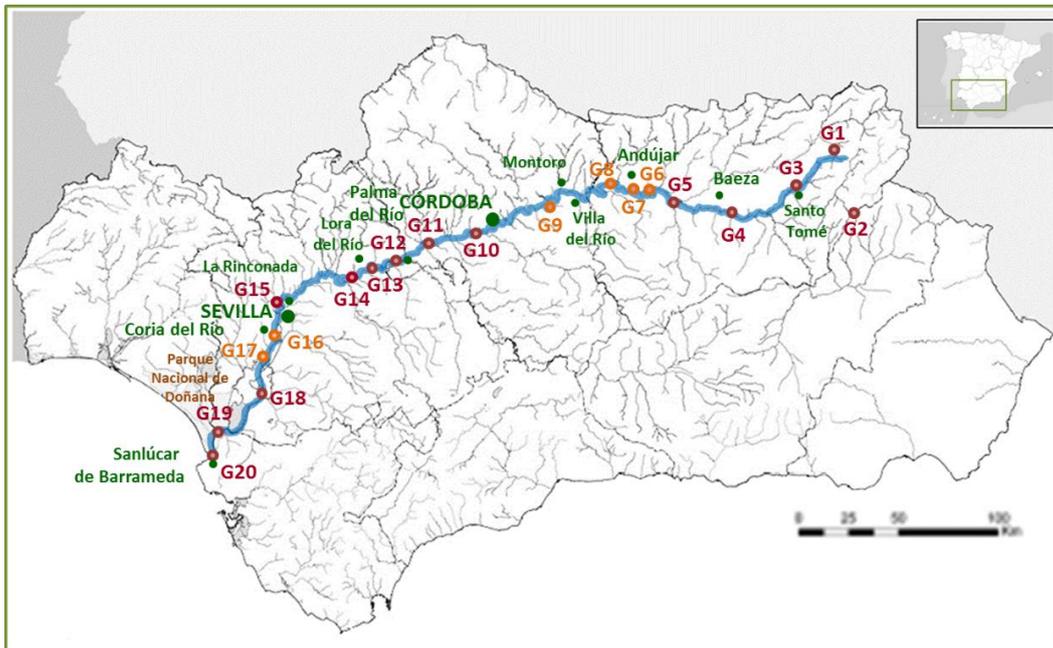


Figura 2: Puntos de muestreo a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.

En concreto, el muestreo se realizó entre el 30 de noviembre y el 1 de diciembre de 2021. De forma más detallada, la Tabla 3 muestra las coordenadas específicas de los distintos puntos muestreados.

Una vez tomadas las muestras de agua, éstas se conservaron en frío (4°C) hasta su traslado a los laboratorios de análisis de la Universidad de Córdoba, donde se determinaron distintas variables fisicoquímicas y se realizó una evaluación metagenómica de las mismas tras el aislamiento del ADN.

Tabla 3: Coordenadas de los puntos de muestreo en el río Guadalquivir y su estuario.

Puntos	Coordenadas		Puntos	Coordenadas	
	N	W		N	W
G1	38°10'26"N	2°47'43"W	G11	37°48'35"N	4°58'44"W
G2	38°01'35"N	2°51'47"W	G12	37°42'06"N	5°18'40"W
G3	38°04'55"N	3°01'42"W	G13	37°41'38"N	5°19'52"W
G4	37°55'37"N	3°18'52"W	G14	37°37'14"N	5°40'39"W
G5	37°58'04"N	3°43'32"W	G15	37°31'06"N	5°58'35"W
G6	37°59'03"N	3°47'59"W	G16	37°18'38"N	6°01'07"W
G7	38°00'56"N	3°59'45"W	G17	37°15'37"N	6°03'42"W
G8	38°03'30"N	4°11'12"W	G18	37°00'32"N	6°09'57"W
G9	38°01'16"N	4°21'34"W	G19	36°54'35"N	6°17'10"W
G10	37°50'40"N	4°50'14"W	G20	36°47'57"N	6°20'22"W

3.2. Caracterización fisicoquímica

La mayor parte de los análisis fisicoquímicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Aguas del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química, así como en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Las variables determinadas fueron: pH, oxígeno disuelto, carbono total (CT), carbono inorgánico (CI) y carbono orgánico total (COT) solubles, sólidos en suspensión totales (SST), minerales (SSM) y volátiles (SSV), clorofilas a, b y c, alcalinidad parcial (AP), total (AI) e intermedia (AI), conductividad, potencial redox, turbidez, cloro residual y dureza, siguiendo protocolos estandarizados (APHA, 1989). Además, se cuantificaron cationes y aniones (norma UNE-EN 10304), metales (normas UNE-EN ISO 11885:2010 y UNE-EN 17053:2018), pesticidas y trihalometanos (guía SANTE/11312/2021). La concentración de *E.coli* y coliformes totales se determinó siguiendo el protocolo PNT-D-080.

Las distintas variables se representaron gráficamente con el programa *SigmaPlot 11.0*.

3.2.1. Índice de calidad del agua

El cálculo del ICA se realizó en la plataforma del *Water Research Center* (<https://www.knowyourh2o.com/outdoor-3/water-quality-index-calculator-for-surface-water>), por tratarse de una de las herramientas utilizadas con mayor frecuencia a nivel internacional para evaluar la calidad de las aguas naturales.

Las variables usadas para cuantificar el ICA fueron: saturación de oxígeno disuelto (%), coliformes fecales (UFC/100mL), pH, concentración de materia orgánica (mg/L), temperatura (°C), fosfatos totales (mg/L), nitrato (mg/L), turbidez (NTU) y concentración de sólidos (mg/L).

El peso de cada variable considerada y la clasificación según el ICA obtenido se encuentran en las Tabla 4 y 5 respectivamente.

Tabla 4 y 5: Peso de las diferentes variables del índice de calidad del agua y clasificación del ICA (WRC, 2022).

Variables	Peso
Oxígeno disuelto	0,17
Coliformes fecales	0,16
pH	0,11
Saturación de O ₂ disuelto	0,11
Temperatura	0,10
Fosfatos totales	0,10
Nitratos	0,10
Turbidez	0,08
Sólidos en suspensión	0,07

Rango	Clasificación
90 – 100	Excelente
70 – 90	Buena
50 – 70	Normal
25 – 50	Mala
0 – 25	Muy mala

3.3. Análisis metagenómico

3.3.1. Extracción de ADN

Se realizó el aislamiento de ADN para identificar la comunidad bacteriana (evaluación metagenómica) presente en las muestras de agua recogidas a lo largo del cauce del río Guadalquivir y en su estuario. Para ello, se filtraron 1500 mL de agua de cada punto de muestreo, a través de papel *Chromatography paper (Whatman) 46 × 57cm (Cat. No. 3030917)* y aplicando vacío (sistema Millipore). Posteriormente, se centrifugaron seis réplicas de cada zona de muestreo en botes de 250 mL a unas 10.500 r.p.m. (aproximadamente 16.000 g; *rotor J14, Centrífuga J2-21, Beckman*) durante 15 min. Tras el centrifugado, las pellas se resuspendieron con unos 2 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 conteniendo 10% glicerol, y se recogieron en tubos Eppendorf. El microbioma (pella de microorganismos) se recogió, tras volver a centrifugar a 16.100 g durante 15 min a 20°C (centrífuga Eppendorf 5415R), y se conservó a -30°C en una cámara de congelación hasta su uso posterior.

La extracción de ADN se llevó a cabo empleando el kit comercial *ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Catalog Nos. D4300T, D4300, D4304)*, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

3.3.2. Evaluación de la concentración y calidad del ADN

A continuación, se midieron las concentraciones de ADN extraído a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro (*DU® 800 UV/Visible Spectrophotometer, Beckman Coulter*), empleando el adaptador HELMA.

De manera complementaria, se realizó una prueba de amplificación del ADN, Polymerase chain reaction (PCR), con el fin de verificar si las muestras son aptas para proceder a una evaluación metagenómica. Se usaron cebadores (“primers”) específicos para los genes que codifican para ADNr 16S, cuya secuencia es la siguiente:

“Forward” (F): 5’-TGGTGG AATTTCCTGTGTAGCGGTGAA-3’

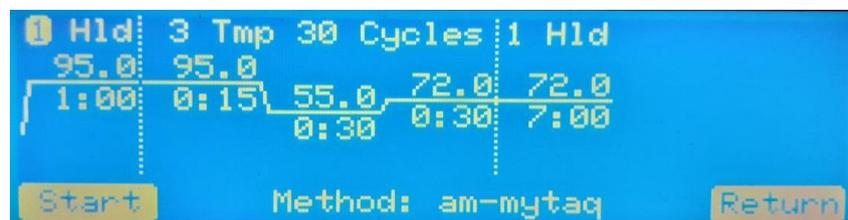
“Reverse” (R): 5’-GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT-3’

Por cada reacción, los reactivos de la PCR fueron:

- 16,5 µL de H₂O mQ.
- 5 µL de tampón (MyTaq Red Buffer).
- 1 µL de “primer forward” ARNr 16S.
- 1 µL de “primer reverse” ARNr 16S.
- 2 µL de ADN molde.
- 0,5 µL de MyTaq Red DNA polimerasa (BIOLINE).

La PCR se realizó con un volumen final de reacción de 26 µL, añadiendo un control negativo (H₂O mQ) y un control positivo, consistente en ADN de un microbioma del suelo que ya se había amplificado previamente y dado un resultado positivo.

Los ciclos del programa empleado para la PCR presentan las siguientes características:



Para visualizar los resultados de la PCR, los productos se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los geles resultantes de la electroforesis se visualizaron con ayuda de un sistema *ChemiDoc™ MP (Bio-Rad)* y el programa de captura de imagen integrado *Image Lab*

(versión 4.1). Se comprobó que el ADN aislado de todos los puntos de muestreo era apto para su análisis metaómico (ANEXO II).

3.3.3. Evaluación metagenómica

Tras comprobar que los resultados de la PCR para todos los puntos de muestreo fueron positivos, se enviaron 20 nanogramos de las muestras extraídas a la Unidad de Genómica del SCAI de la Universidad de Córdoba, en el cual se realizó el análisis metagenómico.

Para la secuenciación de los genes que codifican para el ADNr 16S se empleó el sistema de secuenciación de última generación *Ion Torrent (PGM)*, con el kit comercial *Ion 16S™ Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el programa *Ion Reporter™ 5.0 software Ion 16™ Metagenomics analyses module*. Se obtuvieron datos de identificación taxonómica para 6 parejas de cebadores distintos (V2, V3, V4, V6 V7, V8 y V9) de los microorganismos presentes en las muestras de agua a distintos niveles: filo, orden, familia.

3.3.4. Análisis estadísticos

Los resultados se extrajeron y organizaron con el programa estadístico *Excel*. A partir de los datos unificados se realizaron distintos análisis:

✚ Cálculo del índice de biodiversidad.

Para cuantificar la biodiversidad se calculó el índice de Shannon-Wiener (H'), el cual tiene en cuenta la riqueza de familias y su abundancia, relacionando el número de familias con la proporción de individuos que pertenecen a cada una, y midiendo la uniformidad de la distribución de los individuos (Campo & Duval, 2014).

$$H' = - \sum p_i \times \ln(p_i)$$

p_i : proporción de individuos de la familia i respecto al total de individuos (abundancia relativa de la especie i).

✚ Cálculo de las diferencias significativas

Se empleó el programa *GraphPad Prism 8.0.2*. para comparar los datos de los distintos puntos de muestreo a lo largo de río Guadalquivir respecto al punto más limpio situado próximo a su nacimiento (G1). Para comparar a los distintos niveles taxonómicos (filos y familias), las celdas

con valores perdidos se sustituyeron por un valor de 9, al ser este el límite de detección de la secuenciación. Los datos se normalizaron transformándolos a su logaritmo en base 2. Finalmente, la significación estadística se evaluó con two-way ANOVA seguido por la comparación múltiple *post hoc* de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se expresan como: ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$.

Análisis de clúster

Se usó el programa Genesis para realizar el análisis de clúster o de agrupamientos. Los datos se normalizaron y la distancia empleada fue la correlación de Pearson. Los clústeres se generaron con la opción “hierarchical clustering” con unos parámetros de [2,-2].

Análisis de componentes principales

Con el software Metaboanalyst se hizo un análisis de componentes principales (ACP) a partir del número identificaciones bacterianas a nivel de familia a lo largo del curso del río.

3.4. Correlaciones entre las variables fisicoquímicas y biológicas

Se usó el software *R studio* y el paquete *corrplot* para correlacionar aquellas variables fisicoquímicas, cuyos valores en todos los puntos dieran un valor superior al del límite de detección, con las determinaciones microbiológicas (coliformes totales, *E. coli*) y con los índices de biodiversidad microbiana, todos ellos obtenidos en cada punto de muestreo a lo largo del curso del río Guadalquivir.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de los diferentes puntos a lo largo del cauce de río Guadalquivir pueden dividirse en cuatro apartados diferenciados:

- Resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.
- Evaluación global de la calidad del agua según el ICA.
- Resultados biológicos (metagenómicos).
- Correlación de datos fisicoquímicos y biológicos.

4.1. Caracterización fisicoquímica

4.1.1. Evaluación del pH, oxígeno disuelto y potencial redox

El pH es uno de los indicadores más importantes para evaluar la calidad del agua en entornos naturales, ya que refleja sus características hidroquímicas. Si el pH del agua es muy alto (>9) o bajo (<6,5) imposibilita la supervivencia de la gran mayoría de organismos acuáticos, ya que supone un estrés para el sistema del animal, afecta la tasa de eclosión de los huevos, de mortalidad y supervivencia, etc., (Zebo *et al.*, 2017). Esta variable también afecta a la solubilidad y toxicidad en el agua de sustancias químicas y metales pesados (Fondriest, 2013)

Los valores de pH de los diferentes puntos del río Guadalquivir oscilaron entre 8,00 y 9,00, a excepción del punto E15, que pasa por Coria del Río, cuyo valor de pH fue de 7,75 (Figura 3, izquierda).

El promedio global del pH del río Guadalquivir fue de $8,32 \pm 0,29$. Este valor es adecuado, encontrándose en el rango de otras aguas naturales donde con frecuencia se establece el equilibrio del ácido carbónico, derivado de la solubilización de dióxido de carbono, y que aporta alcalinidad al medio (Trujillo *et al.*, 2008). Dicho equilibrio permite subir el valor de pH hasta cierto punto de forma natural, para oscilar normalmente entre 8,27 y 8,45 (Orenda Technologies, 2022; Trujillo *et al.*, 2008).

En este contexto, el agua de riego de las tierras agrícolas puede ser también una fuente de alcalinidad, además del lecho por el que transcurre el río, fundamentalmente si se trata de terrenos calizos; en cambio, los vertidos de aguas residuales pueden producir una acidificación del pH de los canales de los ríos cercanos (Zebo *et al.*, 2017).

Otra variable importante a tener en cuenta es el oxígeno disuelto en agua, que es vital para la subsistencia de los organismos acuáticos aerobios. Además, cuando la concentración de

oxígeno disminuye, las aguas pierden gran parte de su capacidad autodepuradora. Así, la concentración de oxígeno disuelto es un importante indicador de la calidad ambiental del agua.

En corrientes frías de montaña la concentración de oxígeno disuelto suele rondar entre 7–15 mg/L, mientras que en corrientes más bajas el intervalo de concentración baja a 2–11 mg/L. Concentraciones por debajo de 4 mg/L dificultan, y en muchos casos imposibilitan, la vida de la fauna acuática (Verberk, 2011).

El análisis de las muestras de agua tomadas en el río Guadalquivir mostró que los niveles de oxígeno disuelto alcanzaban una concentración media de $9,35 \pm 1,31$ mg/L (Figura 3, izquierda) con un porcentaje de saturación promedio del 87% y $12,3^{\circ}\text{C}$ de media, siendo el requerimiento mínimo de oxígeno en la mayoría de ríos de 5 a 6 mg/L, valores a partir de los cuales es posible la vida acuática. Por tanto, se puede concluir que las concentraciones de oxígeno disuelto en el río Guadalquivir son adecuados (Peña, 2007).

Por otro lado, el potencial redox es una medida química que representa la actividad de los electrones, midiendo la cantidad de cargas positivas y negativas (moléculas oxidadas y reducidas) presentes en el agua.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la determinación del potencial redox es una medida muy fiable para determinar la calidad sanitaria del agua potable (Albarrán-Zavala, 2008; Manrique, 2021).

Si el medio es reductor, el potencial redox será menor de 75 mV; por el contrario, cuando el valor es mayor a 75 mV, se considera que el sistema es oxidante. Por lo general, un medio reductor se considera un medio contaminado por microorganismos o materia orgánica (Manrique, 2021).

En todos los puntos muestreados del río Guadalquivir el potencial redox mostró valores muy por encima de 75 mV, siendo la media 290 ± 33 mV (Figura 3, derecha). Como consecuencia, se puede decir que, en principio, el agua del río Guadalquivir es un medio oxidante poco contaminado por materia orgánica y/o microorganismos, como se discutirá en apartados posteriores.

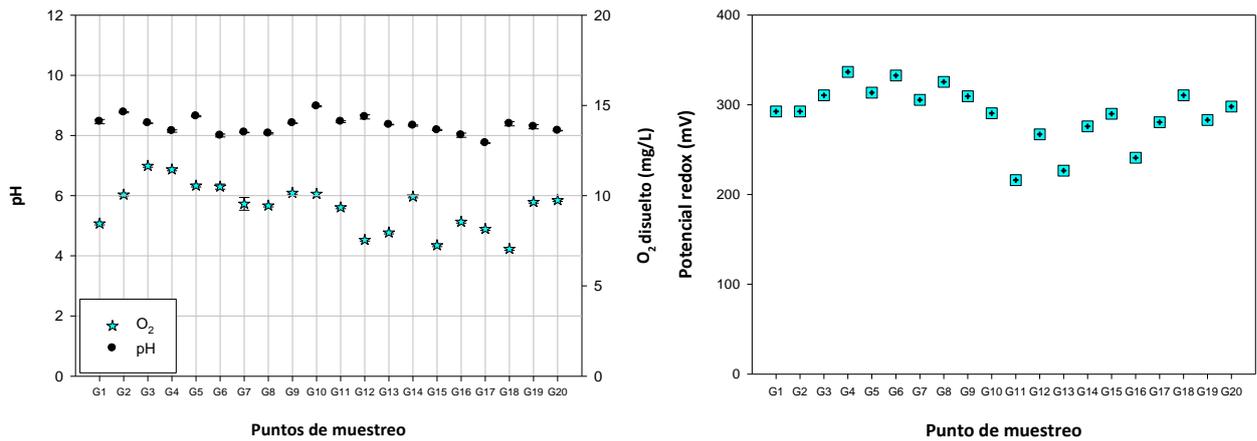


Figura 3: Variación de pH, concentración de O₂ disuelto (izquierda) y potencial redox (derecha) en el agua a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.

4.1.2. Determinación de la concentración de carbono disuelto y alcalinidad

La concentración de Carbono orgánico total soluble es la medida cuantitativa del carbono, inorgánico y orgánico, presente en una muestra líquida. En concreto el CI representa las especies de Carbono Inorgánico en una solución, incluyendo moléculas de dióxido de carbono disuelto, carbonato, bicarbonato y ácido carbónico. El COT soluble deriva principalmente de la descomposición de plantas, crecimiento bacteriano, actividades metabólicas de organismos vivos o de compuestos químicos (Bisutti, 2004).

Es destacable que los ríos juegan un papel fundamental en el ciclo del carbono ya que, entre otros, transforman y transportan el carbono orgánico terrestre. Dado que la concentración de carbono orgánico disuelto se ve afectada por diversos factores, tanto naturales como antropogénicos, ésta se considera un indicador importante de la calidad del agua. Así, una muestra de agua se cataloga como “agua natural” cuando su nivel de COT es menor de 10 mg/L; por el contrario, cuando $COT > 100$ mg/L, se considera que el agua es residual (Bisutti, 2004).

La Figura 4 muestra la concentración de los distintos tipos de carbono a lo largo del río Guadalquivir. Se puede observar cómo en la primera mitad del curso del río los valores de COT (mg/L) se encontraban muy por debajo del límite de 10 mg/L; en el segundo tramo, si bien las concentraciones alcanzaban niveles más altos, se sigue sin superar el límite de COT preocupante. Por tanto, en lo que respecta a la concentración de carbono, se puede afirmar que el río Guadalquivir se encuentra en buen estado medioambiental. No obstante, el incremento en el tramo final puede ser consecuencia de las actividades antrópicas que transcurren en el entorno

del río, así como al aporte de aguas donde no se ha conseguido una elevada eficacia de depuración.

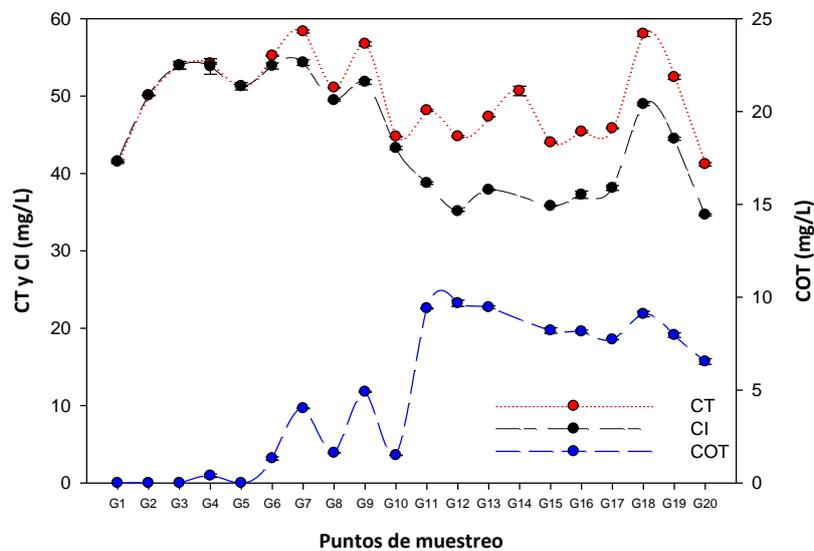


Figura 4: Concentración de las distintas formas de carbono (CT, CI y COT) a lo largo del cauce del río Guadalquivir y en su estuario.

Por otro lado, la concentración de CI osciló entre 34,7–54,3 mg/L, con un promedio de $45 \pm 7,2$ mg/L. Como se ha mencionado anteriormente, este carbono se encuentra principalmente en compuestos simples, como carbonatos y bicarbonatos, siendo una variable que se relaciona íntimamente con la alcalinidad (Osiroff *et al.*, 2015)

La alcalinidad es la capacidad que tiene una muestra líquida para neutralizar o regular cambios en la acidez, es decir, la capacidad amortiguadora del pH de una solución (Sigler & Bauder, 2017). Determinar cuándo un nivel de alcalinidad en agua es alto es complicado, ya que hay muchos factores a tener en cuenta que afectan al pH de la muestra. En aguas naturales la alcalinidad oscila principalmente debido a la presencia de sales. La Tabla 6 muestra los intervalos de calidad en agua potable.

En los puntos muestreados del agua del río Guadalquivir, según los intervalos de la Tabla 6, la alcalinidad total estaría entre valores medios y altos (Figura 5), con una media de 214 ± 42 mg/L CaCO_3 , aunque con importantes variaciones entre puntos, y alcanzando los valores más elevados, de forma puntual, antes de la zona de estuario.

Tabla 6: Intervalos de alcalinidad y efectos en agua potable (Wurts, 2002).

Intervalos	Efectos
Bajo: 0 a 100 mg CaCO ₃ /L	Agua corrosiva si el pH < 7
Medio: 100 a 200 mg CaCO ₃ /L	Sin efectos destacables
Alto: >200 mg CaCO ₃ /L	Depósitos o incrustaciones en tuberías

Una alcalinidad alta no presenta un riesgo directo en la salud humana, aunque, a nivel de infraestructuras urbanas, puede causar obstrucción de tuberías. Adicionalmente, cuando se usan aguas con alcalinidad alta para riegos, el pH del sustrato aumenta progresivamente, lo que deriva en una falta de disponibilidad de ciertos nutrientes, como el hierro, zinc o manganeso.

La deficiencia de hierro en el suelo produce clorosis (blanqueamiento de las hojas jóvenes) en las plantas. No obstante, en este caso se alcanzan valores adecuados para un entorno natural (Abd-Alla *et al.*, 2014; Sigler & Bauder, 2017).

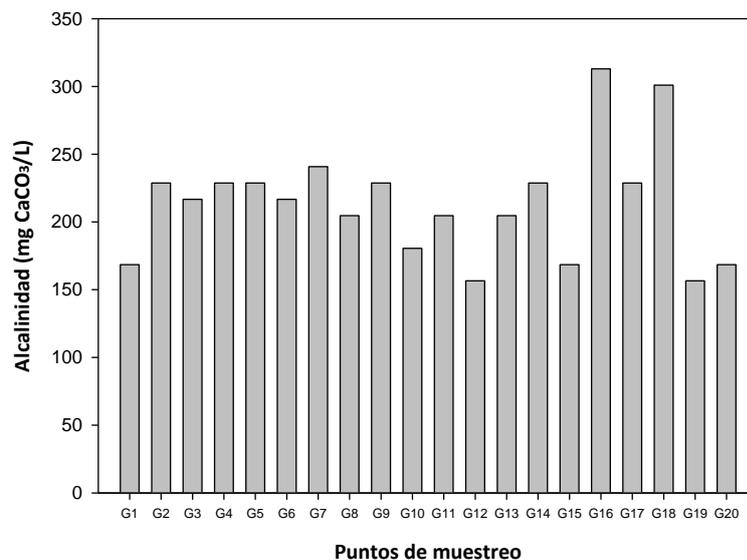


Figura 5: Valores de alcalinidad total (mg CaCO₃/L)

4.1.3. Niveles de sólidos en suspensión y turbidez

La concentración de sólidos en suspensión en aguas es una de sus características físicas más importantes, al informar sobre la cantidad de sólidos no filtrables presentes en las mismas y estar estrechamente relacionada con la turbidez.

En la Figura 6 se muestran los niveles de sólidos en suspensión, tanto minerales (SSM) como volátiles (SSV). La menor concentración de sólidos en suspensión se observó en los primeros puntos de muestreo (G1–G3), con una media de sólidos en suspensión totales (SST) de $3,5 \pm 1,4$ mg/L, mientras que en la parte media del río (G4–G15) el valor medio de SST fue de 46 ± 26 mg/L, y la mayor concentración de sólidos se encontró en el último tramo del río (G16–G20) con un promedio de 302 ± 157 mg/L, aunque con una importante variabilidad. Parece evidente que, a medida que avanza el río, va recibiendo descargas de otros ríos, lo cual, sumado al paso por núcleos urbanos y a las escorrentías provenientes de cultivos, como el olivar, que dejan su suelo desprotegido, suponen una gran fuente de sólidos en suspensión. En cuanto al posible aporte urbano, desde los primeros estudios de caracterización de las aguas hasta los actuales, se ha considerado que gran parte de la contaminación urbana es movilizadada en episodios de lluvia y está asociada a liberación de sólidos en suspensión. Por ese motivo, caracterizar los sólidos en suspensión totales es útil como trazador de otros contaminantes asociados (Anta *et al.*, 2009).

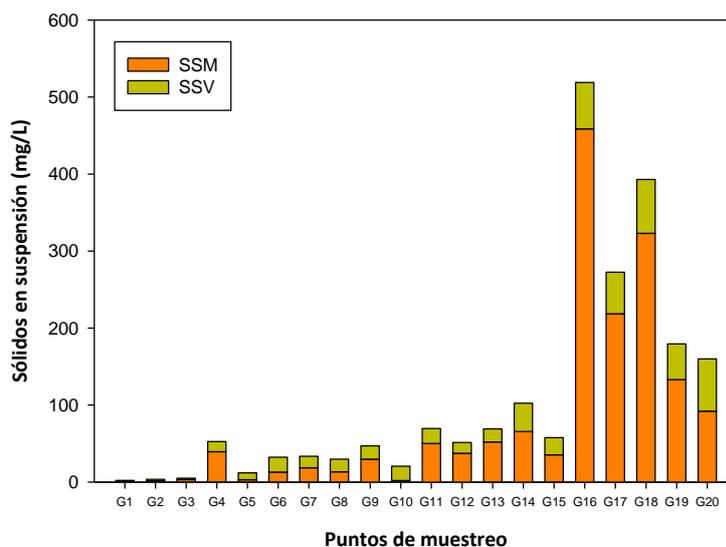


Figura 6: Concentración de sólidos en suspensión, minerales (SSM) y volátiles (SSV), a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.

Los sólidos en suspensión están íntimamente relacionados con la turbidez (Figura 7). La turbidez es el fenómeno que se produce cuando una muestra de agua con partículas en suspensión absorbe y dispersa la luz, y se mide en unidades nefelométricas de turbidez (NTU) (Davies-Colley, 2001).

Esta variable es una de las más importantes a tener en cuenta a la hora de evaluar la calidad de agua para consumo humano y para usos recreativos. Además de tener un impacto visual

negativo, puede ser indicador de contaminación microbiológica o por compuestos tóxicos, los cuales se adhieren a la materia en suspensión (Davies-Colley, 2001; RHB, 2022). Adicionalmente, el aumento de partículas en suspensión influirá en la luz que llegue al medio acuático y condicionar la tasa de oxigenación, ya que un alto nivel de turbidez impide la correcta fotosíntesis de las algas que se encuentren en ese medio (RHB, 2022).

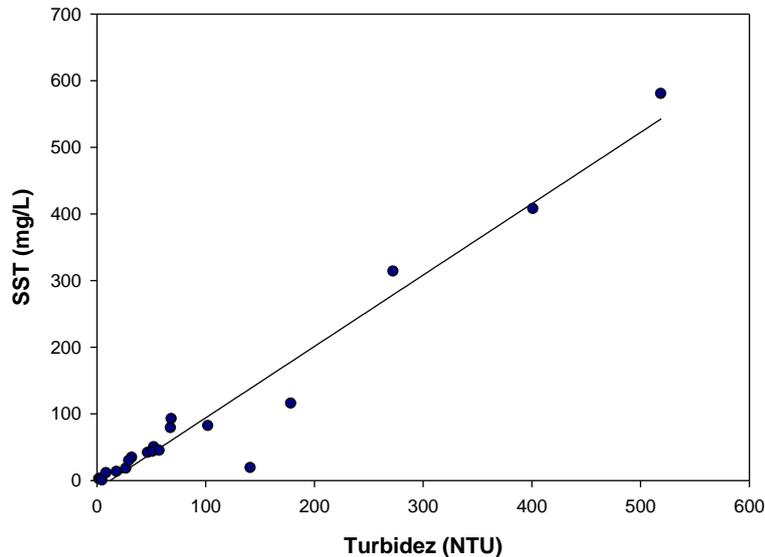


Figura 7: Relación entre los sólidos en suspensión totales y la turbidez.

$$R^2 = 0,9479; y = 0,8851x + 16,93$$

Según la OMS, cuando se habla de agua para el consumo humano, los niveles de turbidez no pueden superar el valor de 5 NTU, e idealmente, debería estar por debajo de 1 NTU. La Figura 8 muestra los niveles de turbidez evaluados a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.

Los únicos puntos muestreados que mostraron un valor inferior a 5 NTU fueron los 3 primeros (G1–G3), ya que al encontrarse cerca del nacimiento no han recibido descargas de otros ríos o procedentes de actividades antrópicas. No obstante, una muestra de agua se puede considerar de baja turbidez cuando se encuentra entre 0–400 NTU.

Como se puede observar en la siguiente figura, solo los puntos G16 y G18 superaron este valor, lo que está en consonancia con la concentración de sólidos en suspensión anteriormente descrita.

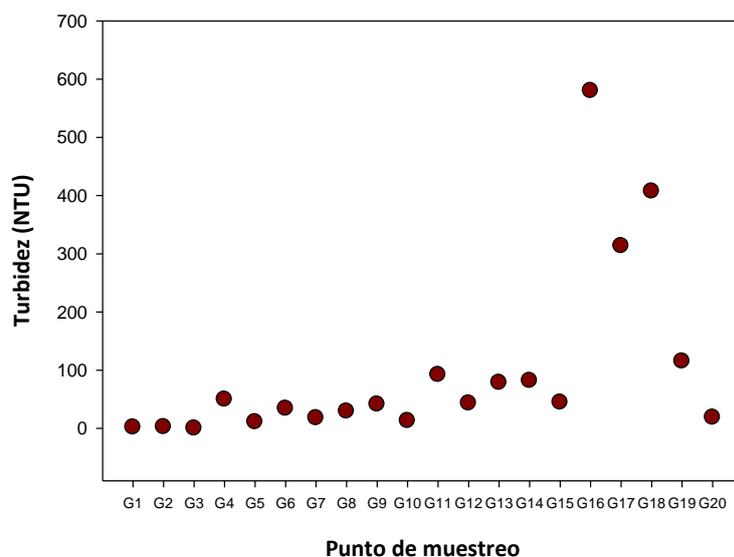


Figura 8: Evolución de la turbidez a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.

4.1.4. Evaluación de iones, conductividad y dureza

Los cationes son iones cargados positivamente, mientras que los aniones están cargados negativamente. La salinidad iónica de los cuerpos de agua normalmente se determina por 4 cationes principales: calcio, magnesio, sodio y potasio, ya que son todos elementos que forman parte de funciones vitales de los seres vivos. Mientras que el sodio y potasio están implicados en el transporte e intercambio iónico, el calcio actúa en diferentes formas en poblaciones vegetales de agua dulce, siendo esencial para su correcto desarrollo y crecimiento. Por otro lado, el magnesio se encuentra presente en todas las plantas con clorofila (Zamora *et al.*, 2016).

Dentro de la categoría de “cationes”, se han analizado las concentraciones de sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}) y amonio (NH_4^+). En el caso del amonio, hay que destacar que en la mayoría de puntos de muestreo la concentración no alcanzó el límite de detección de las técnicas analíticas utilizadas, mientras que en los que sí se pudo medir la concentración, esta fue inferior a 1,4 mg/L (Tabla 7). El resto de cationes se encuentran representados en la Figura 9. La presencia de amonio puede deberse a contaminación urbana, industrial o agrícola, ya que este compuesto puede encontrarse en diferentes restos en descomposición y abonos. Una mayor concentración de amonio puede suponer la proliferación de algas y disminución de materia orgánica en agua (Waterboards, 2010).

Tabla 7: Concentración de amonio en los últimos puntos del río Guadalquivir y su estuario.

Amonio	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20
mg/L	0,430	< 0,1	< 0,1	0,525	1,400	0,800	< 0,5

En relación a los aniones, se han analizado las concentraciones de cloruro (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}), nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}), aunque en este último todos los valores quedaban por debajo del límite de detección ($<5 \text{ mg/L}$) (Figura 9).

En la Figura 9 se observa cómo en el primer tramo del río (G1–G3) la concentración de cationes y aniones fue muy baja, con una media de $160 \pm 85 \text{ mg/L}$, lo que está en consonancia con los valores de conductividad observados. En los siguientes puntos (G4–G17), hasta los puntos de muestreo cercanos al estuario, la concentración promedio fue de $732 \pm 185 \text{ mg/L}$, posiblemente debido a los aportes de escorrentía y efluentes de depuradoras urbanas.

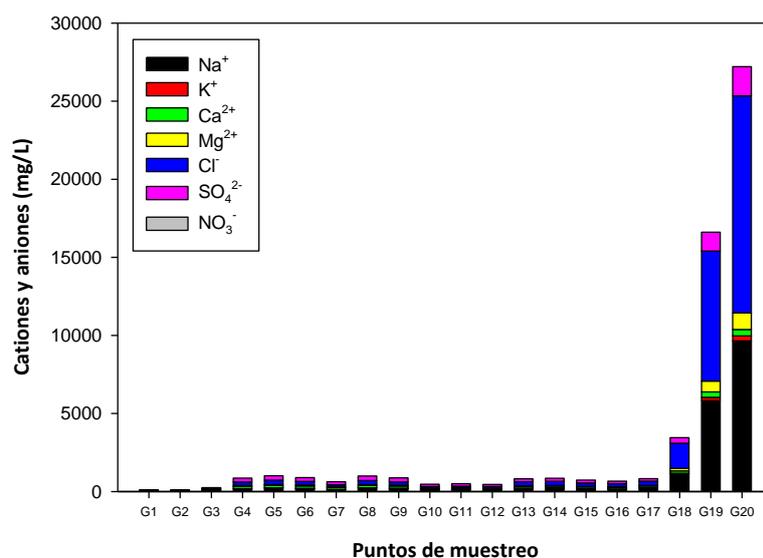


Figura 9: Concentración de cationes y aniones a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.

Por último, en el último tramo destaca el gran incremento en la concentración de algunos cationes y aniones, principalmente sodio y cloro, lo cual probablemente se deba a la interacción de agua de río y mar. El agua del océano Atlántico contiene $33\text{--}36 \text{ g/L}$ de sales, y esta cantidad de sales se dividen principalmente en sodio y cloro provenientes de la sal (cloruro sódico) (Lyman & Fleming, 1940). Esto no quita, sin embargo, que en agua de mar haya otros elementos (Figura 10).

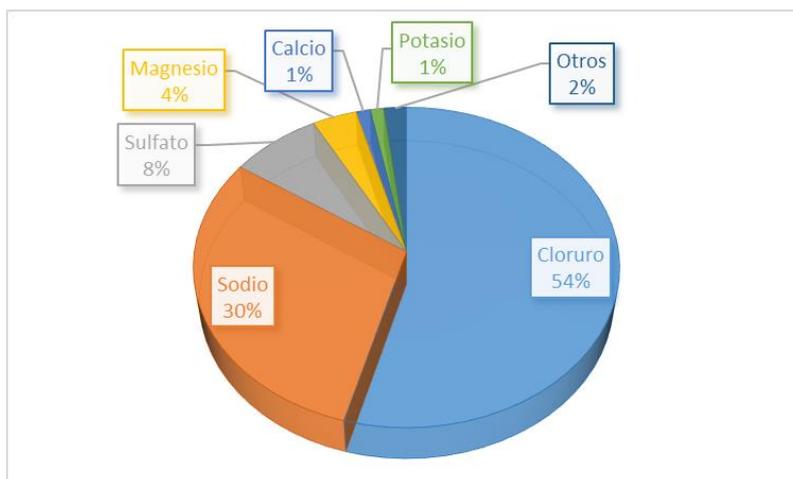


Figura 10: Composición química del agua del mar (Lyman & Fleming, 1940)

Además, en los 2 últimos puntos de muestreo (G19 y G20) se observaba la presencia de sulfato, magnesio, calcio y potasio, elementos presentes en la composición de sales del agua de mar, como se observa en la Figura 10.

Como variable directamente relacionada con la presencia de iones (cationes y aniones) está la conductividad, al hacer referencia al contenido salino del agua. Valores altos de conductividad pueden ser consecuencia de vertidos urbanos y/o industriales, si bien, en otras ocasiones, pueden deberse a procesos naturales de disolución iónica (RHB, 2022). En el caso de las aguas residuales urbanas, el valor límite de vertido establecido para la conductividad en el “*Decreto 109/2015, de 17 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de Vertidos al Dominio Público Hidráulico y al Dominio Público Marítimo-Terrestre de Andalucía*” es de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a 25°C de manera puntual. Por otro lado, los valores normales de conductividad en aguas residuales urbanas oscilan entre 500 a 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

En los muestreos realizados, la conductividad mostró un valor medio de 1.291 ± 498 $\mu\text{S}/\text{cm}$ en la mayor parte del río (G1–G17) (Figura 11, izquierda). Sin embargo, en los últimos puntos del río (G18–G20) esta variable sufrió un incremento del 1.625%, con un promedio de 22.277 ± 1.725 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esto podría deberse a procesos naturales de intercambio de aguas, ya que estos 3 últimos puntos son los más cercanos al estuario, donde se produce la interacción entre el agua dulce del río y la salada del Océano Atlántico. El intercambio de aguas debe ser también el responsable del incremento en la dureza del agua que también se observó en los tres últimos puntos de muestreo (Figura 11, derecha), con una media de 429 ± 123 mg CaCO_3/L en los puntos G1–G17 y ascendiendo a un rango de 1.033 hasta 5.293 mg CaCO_3/L en el estuario.

La dureza es una variable en consecuencia de la concentración de calcio y magnesio en las aguas (Rodríguez, 2009). Una dureza demasiado alta o baja puede llegar a causar daños en ciertas infraestructuras urbanas, como tuberías y piscinas. Si la dureza es alta se favorece la creación de depósitos de cal, mientras que si es baja se promueve la corrosión de elementos metálicos de hormigón. Adicionalmente, tanto si es alta como baja puede causar irritación en la piel y en los ojos (Zamora, 2009). Según la OMS, para aguas potables, el umbral de tolerancia oscila entre 100–300 mg de carbonato de calcio por litro. No obstante, en este caso los valores de dureza observados están en consonancia con la conductividad, siguiendo una tendencia paralela y creciente en los últimos puntos muestreados por las causas anteriormente descritas.

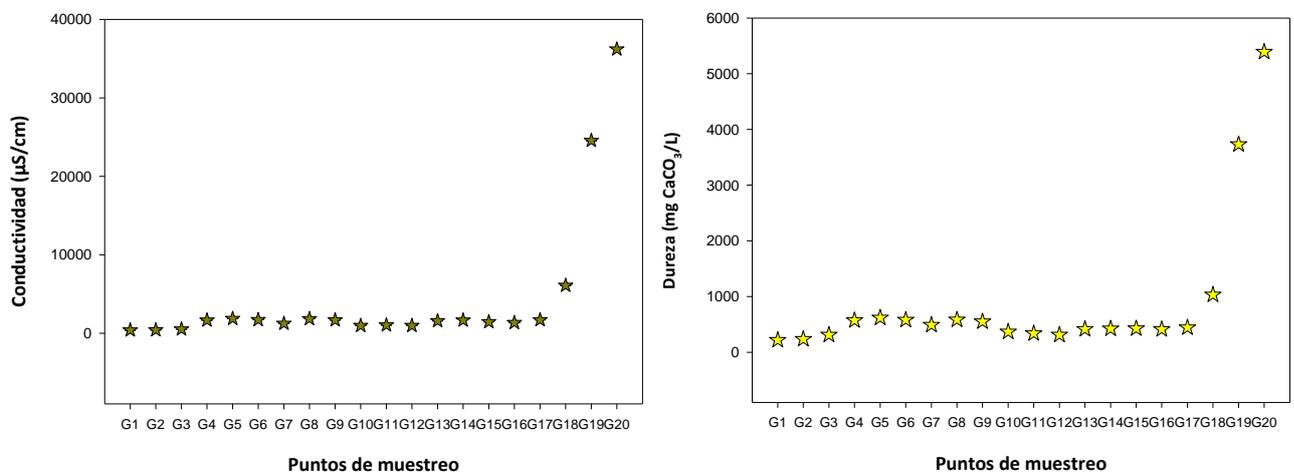


Figura 11: Conductividad (izquierda) y dureza (derecha) del agua evaluados a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.

4.1.5. Determinación de la concentración de metales

Los metales que se midieron fueron: hierro, manganeso, cobre, zinc y níquel, por tratarse de los más relevantes desde el punto de vista medioambiental (Joseph *et al.*, 2019).

Según 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, los límites máximos establecidos son:

- Hierro: 200 µg/L
- Manganeso: 50 µg/L
- Cobre: 2 mg/L
- Níquel: 20 µg/L

Para el Zinc, el Real Decreto 140/2003 no establece un límite; sin embargo, la OMS estableció como límite legal 5 mg/L.

En los primeros puntos de muestreo (G1–G3) las concentraciones de todos los metales cumplen los límites establecidos para agua de consumo humano, lo cual está en consonancia con la premisa de que aquellos puntos cerca del nacimiento del río son los más limpios, a sabiendas de que previo a su consumo generalmente es necesario un proceso de potabilización ampliamente utilizado en la mayoría de los núcleos urbanos.

A partir del punto G4, las concentraciones de metales comenzaron a aumentar, fundamentalmente el hierro y el manganeso (Figura 12). Habría que darle especial importancia al hierro, que llega a marcar concentraciones más de 10 veces superiores al límite marcado por el Real Decreto 140/2003.

Las concentraciones de cobre (Cu), zinc (Zn) y níquel (Ni) no alcanzaron concentraciones superiores al límite de detección, dando como resultado en todos los puntos valores inferiores a 50, 50 y 20 µg/L, respectivamente, a excepción del último punto del río (G20) en el cual la concentración del cobre alcanzó los 92,9 µg/L.

En 2004, Ecologistas en Acción remitió un informe a la Comisión Europea de Medio Ambiente para detener un proyecto minero “Cobre de las Cruces”, una mina a cielo abierto para la extracción de cobre, que suponía un deterioro para el estuario del Guadalquivir. A pesar de ello, el proyecto siguió su curso y, desde ese entonces, la empresa promotora ha sido sancionada en numerosas ocasiones por comprometer la salud medioambiental del acuífero y estuario del río Guadalquivir (Ecologistas en Acción, 2004; Pizá, 2018; Rejón, 2021).

Quizá este hecho podría ser uno de los motivos de la aparición de dicho metal en las aguas, si bien se requieren estudios adicionales que lo ratifiquen.

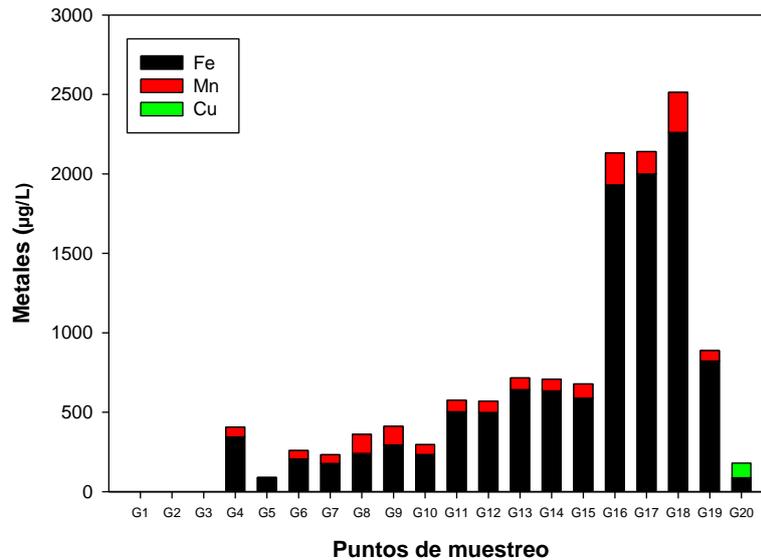


Figura 12: Concentraciones de metales (hierro, manganeso y cobre) en los distintos puntos del río Guadalquivir y de su estuario.

Los niveles de Fe y Mn, indetectables en los primeros puntos de muestreo (G1-G3), empezaron a detectarse a partir de G4, con concentraciones de 680 ± 695 y 88 ± 63 $\mu\text{g/L}$ para el Fe y el Mn, respectivamente. Muy significativo fue el gran incremento experimentó el Fe a partir del punto G15, alcanzado niveles máximos de hasta 2.261 $\mu\text{g/L}$ en G18, para después volver a disminuir en el estuario (G19 y G20).

Las concentraciones tan elevadas de Fe podrían deberse a que, previo a ese punto se encuentra la desembocadura del río Guadaíra (Figura 13), río que se ha considerado durante muchos años uno de los más contaminados de Europa, debido a que en él se vierten productos empleados para el lavado y aderezo de la aceituna, que generalmente poseen altos niveles de hierro (Lucena, 2016).

Para tratar de controlar estos vertidos se impuso una sanción de más de 600.000 de euros a la empresa causante de los vertidos (Rincón, 2007). Lamentablemente, son muchas las empresas acusadas de verter ilegalmente en este río y hoy día aún no se ha controlado la situación (Glez, 2019).



Figura 13: Desembocadura del río Guadaíra en el Guadalquivir y localización del punto de muestreo G16 (Google Maps).

4.1.6. Evaluación de los niveles de pesticidas y trihalometanos

Dada la importancia histórica de la actividad agronómica en el entorno del río Guadalquivir, se ha realizado un seguimiento de los principales pesticidas utilizados en dicho contexto, con el objetivo de evaluar su posible impacto sobre el ecosistema acuático en estudio. En concreto, los pesticidas analizados fueron el diurón, la simazina y la terbutilazina. Para todos ellos, las concentraciones en la mayor parte del río (G1 – G14) no alcanzaron los límites de detección (<20 ng/L), a excepción del punto G10, en el cual, para el diurón, se obtuvo una concentración de 22 ng/L. Además, en los últimos puntos del río, sí se pudieron medir ciertas concentraciones de estos pesticidas (Tabla 8).

Tabla 8: Concentración de pesticidas detectados en el último transecto del río Guadalquivir.

Concentración (ng/L)	G15	G16	G17	G18	G19	G20
Diuron	< 20	< 20	22,6	23,7	20	298
Simazina	46,4	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Terbutilazina	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	22

El diurón es un compuesto herbicida que se usa en agricultura y que muestra una gran persistencia en el medioambiente. La exposición a altas concentraciones de este pesticida puede provocar alteraciones en la sangre y llegar a causar tumoración y cáncer. Al ser vertido en aguas superficiales puede quedar retenido en los sedimentos y causar toxicidad en organismos acuáticos e incluso su muerte (PRTR, 2007). La simazina es otro herbicida capaz de contaminar

el suelo y aguas subterráneas. La exposición prolongada a este biocida puede tener efectos deletéreos en hígado, riñones y sistema circulatorio, además de producir lesiones genéticas. Si bien se ha descrito que posee una baja toxicidad en los peces, sin embargo, se cataloga como sustancia muy persistente debido a que su degradación en el medioambiente es muy lenta y se bioacumula (PRTR, 2007). Por último, la terbutilazina, es un herbicida que puede irritar y causar graves lesiones en los ojos, además de ser un producto muy tóxico para el medioambiente acuático, debido también a su elevada persistencia (Tasca, 2018).

En principio, la agricultura debe ser la primera causa que justifique la presencia de estos pesticidas en el río Guadalquivir. Así, su uso no controlado puede contaminar suelos y acuíferos; adicionalmente, estos productos pueden llegar al río por medio de escorrentías.

Otros contaminantes cuyas concentraciones se evaluaron fueron los trihalometanos, de los cuales se midieron: cloroformo, clorodibromometano, diclorobrometano y bromoformo. Para todos ellos, en todos los puntos del río, las concentraciones obtenidas estuvieron por debajo del límite de detección del equipo ($<10 \mu\text{g/L}$).

En los años 2006–2008, en Gipuzkoa, se realizó un estudio tomando agua de 33 puntos de muestreo de la red hidrográfica para comprobar el riesgo en la salud que podrían suponer los niveles de trihalometanos, llegándose a la conclusión de que concentraciones menores a $10 \mu\text{g/L}$ implicaban un riesgo bajo (Santa *et al.*, 2010).

4.1.7. Determinación de la concentración de cloro residual libre

El cloro es el agente más usado en todo el mundo como desinfectante para el agua de consumo humano, ya que debido a su fuerte carácter oxidante es capaz de destruir patógenos y otros compuestos que causan el mal sabor del agua. Es un compuesto fácil de controlar y está comprobada su inocuidad si se utilizan las concentraciones (Pereira, 2013). En tratamiento de aguas residuales, cuando el agua se ha depurado y se somete a un tratamiento terciario previo a su vertido, se suele aplicar cloro en exceso (2 mg/L aproximadamente) para purificarla y oxidar pequeños restos de compuestos contaminantes y microorganismos que aún pudieran encontrarse en ella. Tras el procedimiento, este cloro queda en el agua como cloro residual libre y sigue desinfectando el agua a la vez que disminuye su concentración progresivamente, por lo que es normal encontrar pequeñas cantidades de este compuesto tanto en aguas de ríos como en agua de mar si se vierten aguas depuradas en zonas cercanas (Sheikhi *et al.*, 2014).

La OMS indica que, a pesar de que no se ha observado ningún efecto adverso en los humanos expuestos a cloro libre en agua potable, el valor de este componente no debe superar los 5 mg/L, tratándose este límite de un valor conservador. En España, la normativa vigente, en materia de criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano que se aplica a los abastecimientos, queda recogida en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, con un límite de 1 mg/L. En el muestreo realizado los valores de concentración de cloro residual no superaron en ningún caso los 0,10 mg/L. Cabe resaltar que la ausencia o niveles bajos de cloro residual libre no implica la presencia de contaminación microbiológica (Castro *et al.*, 2021).

4.1.8. Determinación de la concentración de clorofila

Además de las variables fisicoquímicas anteriormente descritas, se realizó un seguimiento de la concentración de clorofila a lo largo del río Guadalquivir. La clorofila es una familia de pigmentos que permiten a los organismos fotosintéticos realizar la fotosíntesis, transformando la energía del sol en energía química. De los tipos de clorofila existentes, en este estudio se han determinado tres, las clorofilas a, b y c (MacIntyre, 2002), cuya evaluación puede informar sobre la proliferación de microorganismos fotosintéticos en el cauce del río. Según Ferruzi y Blakeslee (2007), las características de estos tipos de clorofila son las siguientes: Las clorofilas a y b poseen color verde y están presentes en plantas y algas. Por su parte, la clorofila c se encuentra en ciertas categorías de algas, especialmente en los dinoflagelados, siendo su color rojizo. La clorofila a es capaz de absorber la luz y posibilita la transformación de energía lumínica a química, mientras las clorofilas b y c aumentan la capacidad de absorción de luz por parte de la clorofila a.

Como se muestra en la Figura 14, la categoría de clorofila con mayor presencia en los muestreos realizados fue sin lugar a duda la clorofila a, seguida por la clorofila c. Además, los niveles de clorofila subieron a partir de G9, alcanzando un máximo en G14.

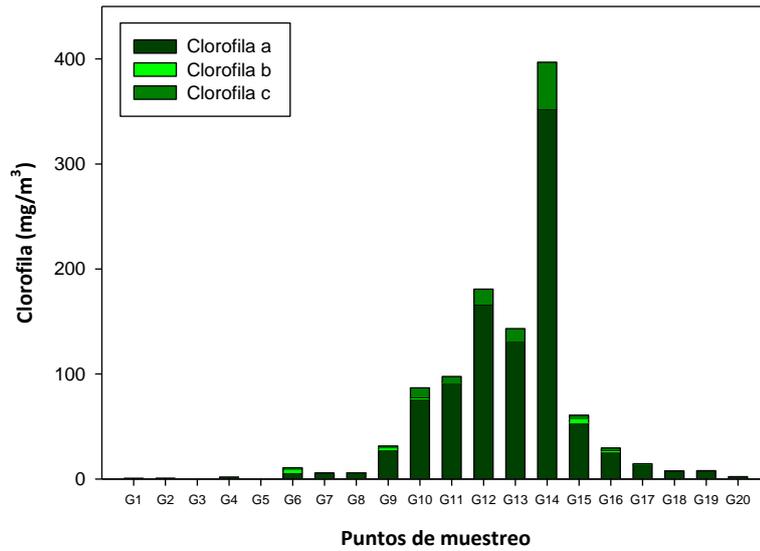


Figura 14: Niveles de distintos tipos de clorofila evaluados a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.

La figura 15 muestra cómo se correlacionan las concentraciones de carbono orgánico total y de nitratos con la clorofila a. Según la figura, una de las posibles causas de la proliferación de microorganismos fotosintéticos podría ser la presencia de nitratos, si bien el COT no influye al tratarse de microorganismos fundamentalmente autótrofos.

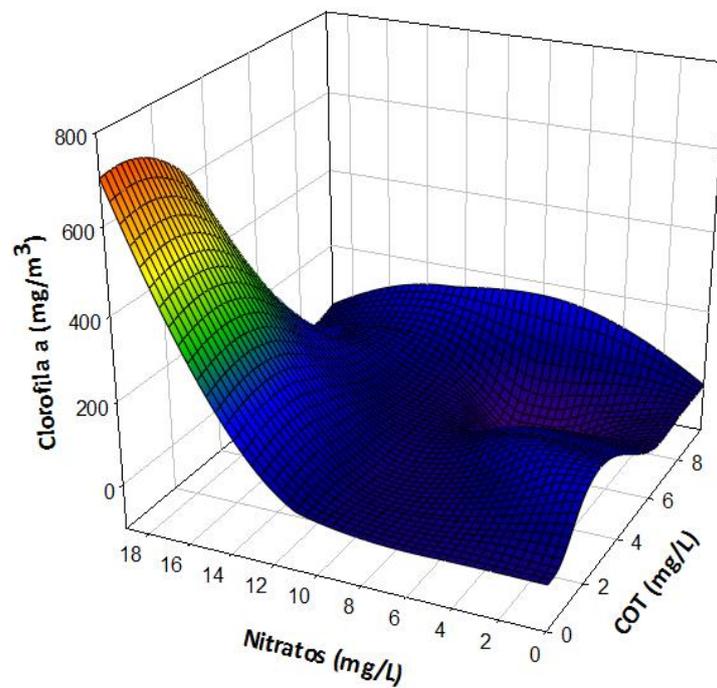


Figura 15: Relación entre las concentraciones de carbono orgánico total, nitratos y de clorofila a.

4.1.8. Bacterias coliformes totales y *E. coli*

Las bacterias coliformes incluyen un gran grupo de bacterias que habitan en el intestino de humanos y animales, ayudando a la digestión de la comida, la mayoría de las cuales son inocuas para los humanos, por lo que, en principio, la presencia de coliformes en el agua no implica que su consumo cause enfermedad (Payus & Nandini, 2014). Su presencia indica que existe una vía de contaminación desde una fuente de bacterias (sistemas sépticos, heces de animales...) a un curso de agua. Esta vía puede ser utilizada por aquellas otras bacterias que sí pueden causar enfermedades (Swistock & Sharpe, 2016). *E. coli* es un tipo de coliforme, concretamente una bacteria fecal, que normalmente se encuentra en el intestino de animales y humanos. En este caso, un resultado positivo es más serio, ya que puede indicar que desechos animales o humanos han estado o están en contacto con el agua (Swistock & Sharpe, 2016). Aunque la mayoría de bacterias *E. coli* no causan enfermedad, cuando una persona contrae una enfermedad por *E. coli* (generalmente a través de alimentos o agua contaminada), ésta puede diseminarse por el cuerpo a través de la sangre, hígado y sistema nervioso, aunque la zona primaria de infección es el tracto gastrointestinal, causando náuseas, vómitos, fiebre, etc., (Rock & Rivera, 2014).

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, indica un límite máximo de coliformes de 0 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en 100 mL de muestra. Para *E. coli*, el nivel permitido para agua potable es, dependiendo del tipo de agua (Tabla 9):

Tabla 9: Niveles de *E.coli* permitidos según el tipo de agua (Rock & Rivera, 2014)

Uso	Nivel permitido (UFC/100 mL)
Agua potable	0
Aguas superficiales con contacto corporal completo	235
Aguas superficiales con contacto corporal parcial	575
Aguas residuales de riego	<2,2
Aguas residuales de descarga	<1,0

Las Figura 16 muestra los niveles de coliformes y, específicamente, dentro de este grupo los niveles de *E. coli*, respectivamente, determinados en aguas del río Guadalquivir. Se observó que había una presencia importante de coliformes a lo largo de todo el curso del río, salvo en el nacimiento y en los puntos de la desembocadura, destacando un aumento muy elevado de los

niveles de coliformes en determinadas localizaciones, como fueron: G6-G7, G11, G14, G16-G17 (Figura 16, izquierda). Respecto a la Figura 16 (derecha), se observó un incremento significativo en G11 de *E. coli*, con un valor de 3.000 UCF/100 mL, muy superior al resto, sin embargo, no fue este punto el que presentó los valores más altos de coliformes.

Haciendo incidencia en el punto G14, donde se encuentra la mayor concentración de coliformes con 25.000 UFC/100 mL, previo a este punto desemboca el río Corbones. En 2018 este río se encontraba muy contaminado y con niveles de oxígeno tan bajos que era común encontrar peces muertos. Asimismo, el río pasaba por grandes periodos de sequía en los que el curso de agua desaparecía (García, 2018). En 2019, se empezó una labor de restauración para retirar 15.000 m³ de sedimentos y vegetación muerta que impedía que el río fluyera (CHG, 2019), lo que puede ser la causa del alto nivel de coliformes, ya que al fluir de nuevo el río, se pueden haber lavado los restos de materia orgánica hasta desembocar en el Guadalquivir.

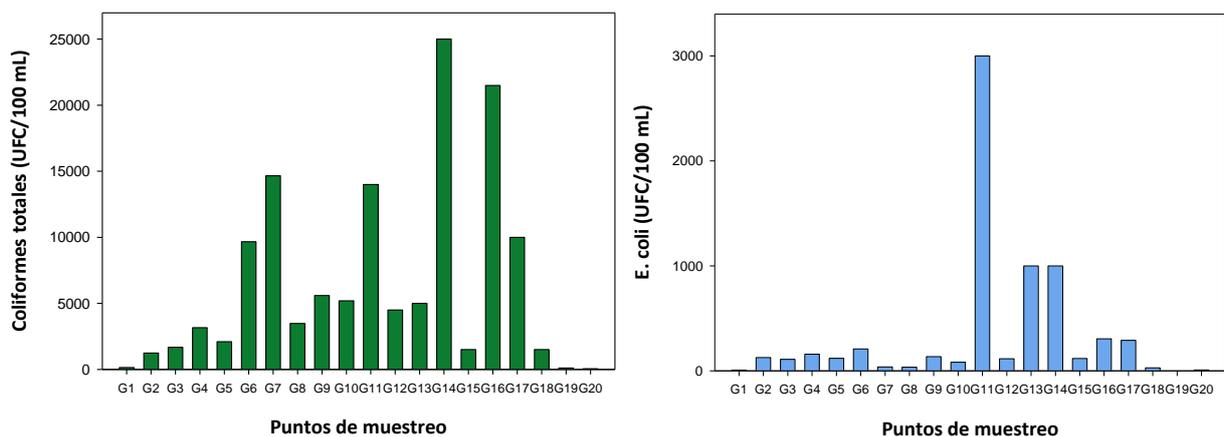


Figura 16: Niveles de bacterias coliformes (izquierda), y específicamente de *E. coli* (derecha), determinados en agua a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.

Por otro lado, el incremento de coliformes y de los niveles de *E.coli* a partir del punto G13 también puede explicarse por encontrarse la desembocadura del río Genil previo a dicho punto de muestreo. Este afluente lleva arrastrando problemas desde 1995, empezando por el revestimiento de hormigón en su paso por Granada, que afecta gravemente a su cauce y que está acabando con su vegetación y fauna autóctonas (Sarrión, 2022).

En la actualidad, el Genil se posiciona como uno de los ríos más contaminados y de peor calidad de Andalucía, debido a numerosas modificaciones del cauce y continuos vertidos de aguas sin depurar (Muñoz, 2020).

4.1.10. Índice de calidad del agua

Para tener una visión global que incorpore los principales indicadores medidos en la calidad del agua de forma conjunta, se ha calculado el ICA. Como se aprecia en la Figura 17, a medida que avanza el curso del río, el ICA va disminuyendo, pasando de una calidad “Buena” al inicio del Guadalquivir, entre los puntos G1–G5; en el tramo intermedio (G6–G15) la calidad pasa a ser “Regular” y, por último, en el último transecto, el ICA disminuye hasta llegar a un nivel de calidad “Mala”. No obstante, en los dos últimos puntos, el índice mejora, lo que puede deberse al intercambio de aguas, que diluye las concentraciones de algunos contaminantes.

En el río Manzanares, Madrid, se realizó un estudio evaluando el índice de calidad del río en diferentes tramos de éste, desde el sector periurbano previo a la ciudad hasta el periférico, determinándose que, tras el paso del cauce por la zona urbana, su calidad ambiental disminuye hasta un 50% (Da Silva, 2018), al igual que ocurre con el río Guadalquivir, aunque a mayor escala.

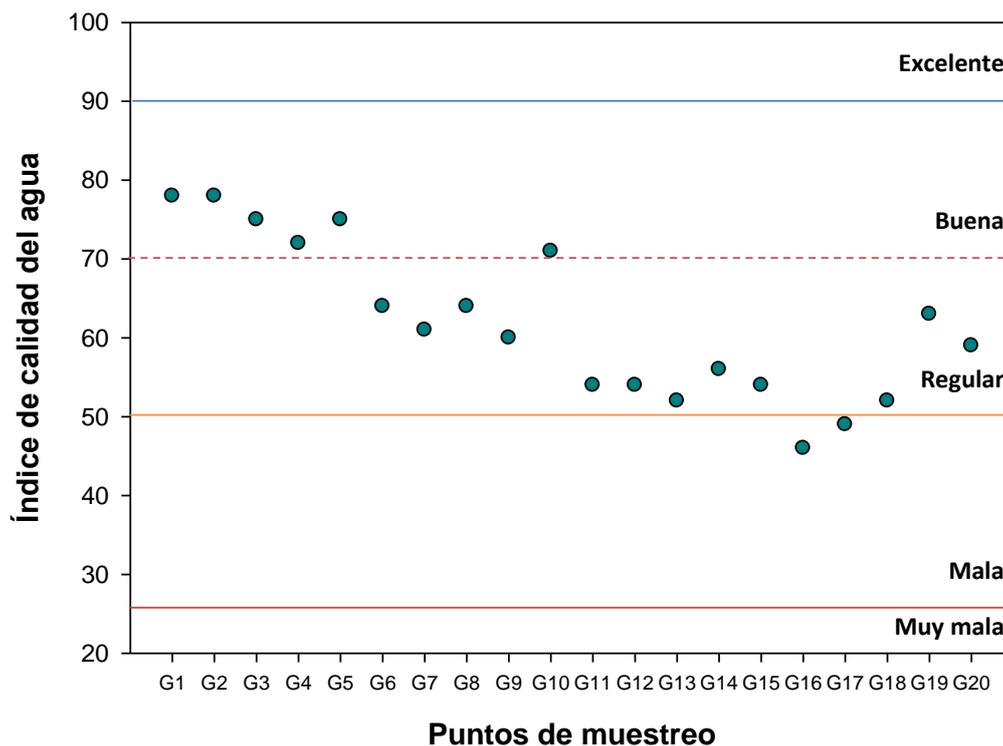


Figura 17: Índice de calidad del agua a lo largo del río Guadalquivir y en su estuario.

4.2. Análisis metagenómico

4.2.1. Identificaciones microbianas a nivel de filo

El análisis metagenómico del agua permitió evaluar los microorganismos presentes a lo largo del curso de río Guadalquivir y en su estuario a distintos niveles taxonómicos. Se obtuvo una media de 20.944 ± 5.871 identificaciones por punto de muestreo, siendo el valor máximo de 30.953 (G5) y el mínimo 9.628 (G20). Realizando una comparación con el punto más limpio (G1), se observó un leve incremento en el número de identificaciones en la primera mitad del río (G3–G7), seguido de un descenso hasta el tramo G17–G18, donde la abundancia de microorganismos vuelve a aumentar, para luego sufrir nuevo descenso en los dos últimos puntos del río (G19–G20), localizados ya en el estuario.

La Figura 18 muestra el número de identificaciones de los distintos filos de bacterias presentes en el agua de río. El filo con mayor presencia fue Proteobacteria, con una proporción de alrededor del 68% de las lecturas totales en todos los puntos del río, seguido por Actinobacteria, cuyo porcentaje fue próximo al 20%. Aquellas zonas en las que se observó un incremento en el número de identificaciones, desde el punto G3 hasta G8 y en los puntos G17–G18, el filo Proteobacteria crecía de forma significativa respecto al resto, con una representación de casi el 80% en los puntos mencionados. Dentro de las bacterias, las Proteobacterias es un filo principal en cursos de agua dulce (Kurokawa *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2012).

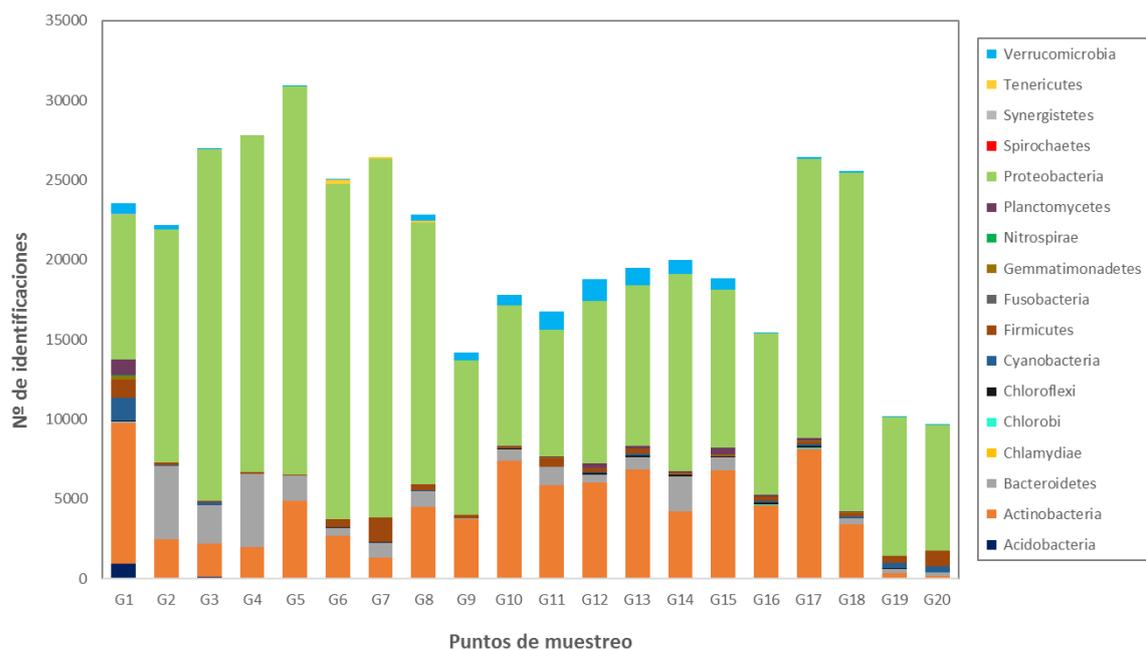


Figura 18: Evolución de los cambios a nivel de filo en el microbioma de aguas recogidas a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.

Con porcentajes más reducidos se encontraron otros filos: Bacteroidetes (en torno al 5,5%), Firmicutes (1,8%) y Verrucomicrobia (2%). Por último, en proporciones muy bajas (<1%) se encontraban los filos: Acidobacteria, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Spirochaetes, Synergistetes y Tenericutes.

Los cambios estadísticamente significativos en la evolución de los distintos filos a lo largo del río se evaluaron comparando con el punto G1, considerado el más limpio al encontrarse muy próximo al nacimiento del río. Esta consideración estuvo refrendada por las distintas determinaciones fisicoquímicas evaluadas previamente en este trabajo. Los filos que mostraron cambios significativos se recogen en la Tabla 10. Salvo el caso de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria, que mostraron un incremento exclusivamente en el punto G3, el resto de los cambios observados fueron todos disminuciones en el número de identificaciones respecto a G1. Así, los filos Acidobacteria y Nitrospirae presentaron una tendencia similar, al mostrar un descenso significativo en todos los puntos del río respecto al G1. Los niveles de Cyanobacteria y Gemmatimonadetes cambiaron significativamente en casi todos los puntos de muestreo, salvo excepciones puntuales situadas en la segunda mitad del río. En el caso de los filos Planctomycetes y Verrucomicrobia, las variaciones se encuentran concentradas en las secciones del río que comprenden los puntos G1–G9 y G18–G20. Finalmente, Actinobacteria y Firmicutes solo variaban en ciertas localizaciones próximas al nacimiento y a la desembocadura del río.

Tabla 10: Filos bacterianos que mostraron diferencias significativas de abundancia en los distintos sitios del río Guadalquivir respecto al punto inicial (G1).

Filos	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20
Acidobacteria	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Nitrospirae	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cyanobacteria	*	**	***	**	***	***		**	**	***	*		***	*	*	*			*
Gemmatimonadetes	*	**	*	*	*	*	*	*	*			**	*		*		*	*	*
Planctomycetes	**	**	**	**	**	**	**	**	**								**	*	**
Verrucomicrobia			*	*	*	*											*	*	*
Actinobacteria	*	*	*																**
Firmicutes			*													*			
Bacteroidetes		**																	
Proteobacteria		*																	

Las celdas verdes representan filos cuya abundancia disminuye y las rojas aquellas otras que sufren un incremento en el número de identificaciones respecto al punto G1. Las significaciones estadísticas son: ***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$.

4.2.2. Identificación de microorganismos a nivel de familia

A nivel de familia, el análisis metagenómico permitió identificar 140 familias. En la Figura 19 se muestra la evolución a lo largo del río de aquellas familias cuyo porcentaje de representación en todo el curso era mayor a 1%. Con gran diferencia, la más abundante fue Comamonadaceae, una familia del filo Proteobacteria, con casi un 34% de representación. Hay que destacar que esta familia presentó un incremento en el número de identificaciones entre G3-G7, primer tramo en el que aumentaron el número de identificaciones totales. Comamonadaceae es una familia bacteriana grande y diversa que suele encontrarse en el agua y suelo, que pertenece al orden Burkholderiales y que se amplía regularmente con nuevos géneros y especies. Actualmente comprende cerca 30 géneros y 100 especies, entre los que hay anaerobios, aerobios, desnitrificadores, bacterias oxidantes de hidrógeno, organotrofos, etc., (Willems, 2014). Los géneros de esta familia forman un grupo filogenético con un nivel relativo de similitud en la secuencia del gen ADNr 16s de entre el 93–97% (Willems, 2014).

El resto de familias representadas no superaron ninguna el 10% de representación.

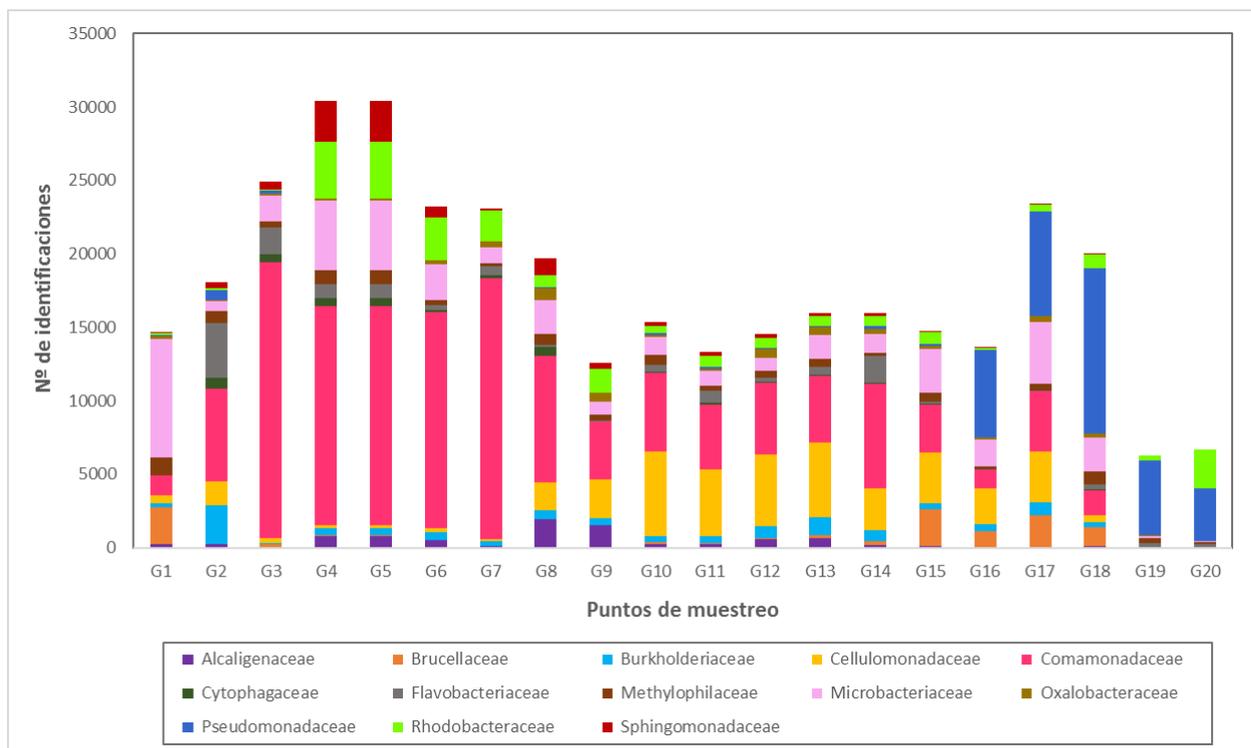


Figura 19: Evolución de la abundancia de las distintas familias microbianas identificadas a lo largo del cauce del río Guadalquivir y en su estuario. Sólo se muestran aquellas familias cuyo porcentaje de representación fue superior al 1%.

Para evaluar la biodiversidad, se calculó el índice de Shannon-Wiener (H') de las familias de microorganismos en todos los puntos a lo largo del curso del río, resultados que se muestran en la Figura 20. La zona próxima al nacimiento del río (G1) fue la que presentó el mayor índice de biodiversidad, con un valor de H' de $2,82 \pm 0,13$, valor que fue más bajo en el resto de localizaciones. Hay que destacar que hubo una disminución estadísticamente significativa en dos tramos del río: 1) Una primera de mayor magnitud en el primer tramo del río (G3–G7), que coincidía con el aumento ya indicado en el número de identificaciones. 2) una segunda de menor magnitud al final, en los dos puntos de muestreo situados en el estuario (G19–G20), donde también descendía de forma notoria el número de identificaciones.

Diferentes estudios demuestran que la diversidad biológica disminuye en gran medida al exponerse a contaminación ambiental de origen antrópico. Adicionalmente, se observa una relación entre las fuentes de vertidos industriales y urbanos con el aumento de individuos de géneros bacterianos potencialmente patógenos (Paruch *et al.*, 2019; Köchling *et al.*, 2017)

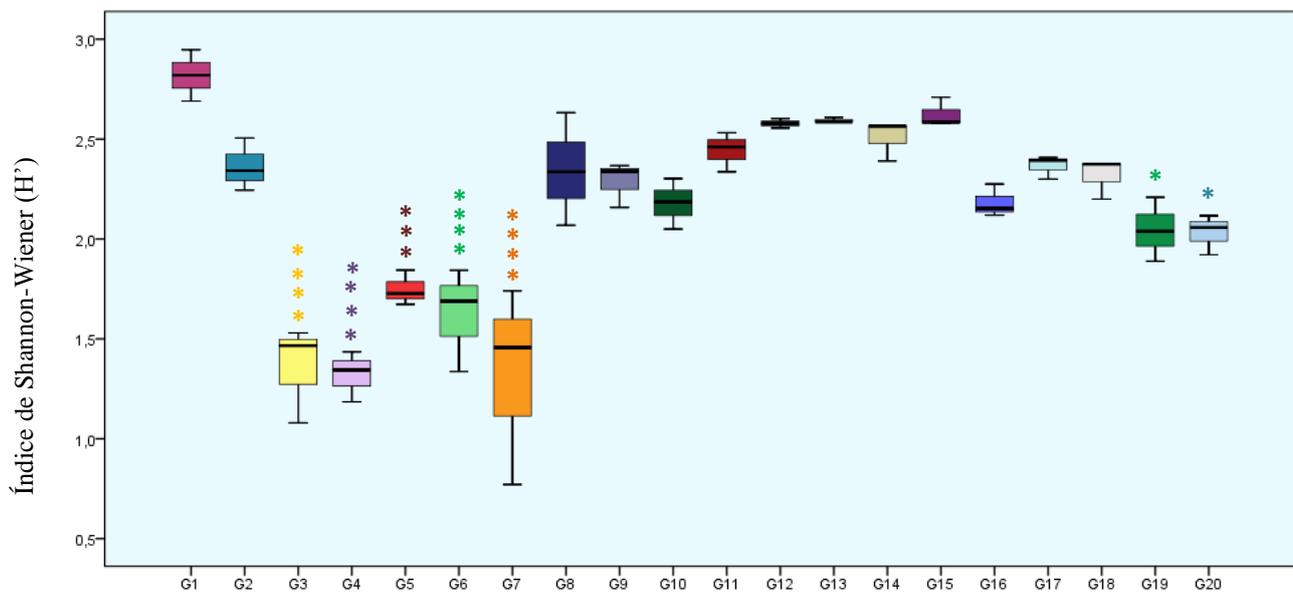


Figura 20: Diversidad bacteriana a nivel de familia evaluada a largo del curso del río Guadalquivir mediante el índice de Shannon-Wiener. Las diferencias significativas respecto a la localización G1 se expresan como: ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$.

Con el número de identificaciones a niveles de familia, se realizó un análisis de componentes principales, tratando de simplificar un espacio muestral tan complejo sin perder información relevante (Figura 21). En la figura, en el eje X se encuentra el componente principal 1, que

posee el 18,1% de la información original, aquella relevante para ver las diferencias significativas, mientras que en el eje Y está el componente principal 2, con el 14,2% de la información.

Como puede observarse en el análisis de componentes principales (Figura 24), existía una evolución progresiva con una tendencia circular, de forma que aquellos puntos en los que se observa un comportamiento diferente son: el primer punto de muestreo (G1) y los últimos (G16–G20). Esto tendría sentido ya que el G1 es el punto más limpio del río, mientras que los últimos son aquellos que, por un lado, están más contaminados ya que podrían haber ido acumulando los vertidos, escorrentías, y otros posibles depósitos. Adicionalmente, los 3 últimos puntos (G17–G20) al estar cerca de la desembocadura, se produce intercambio de aguas del río Guadalquivir con el océano Atlántico y su concentración de sales aumenta, cambiando las condiciones del entorno y, por ende, la capacidad de supervivencia de la fauna bacteriana.

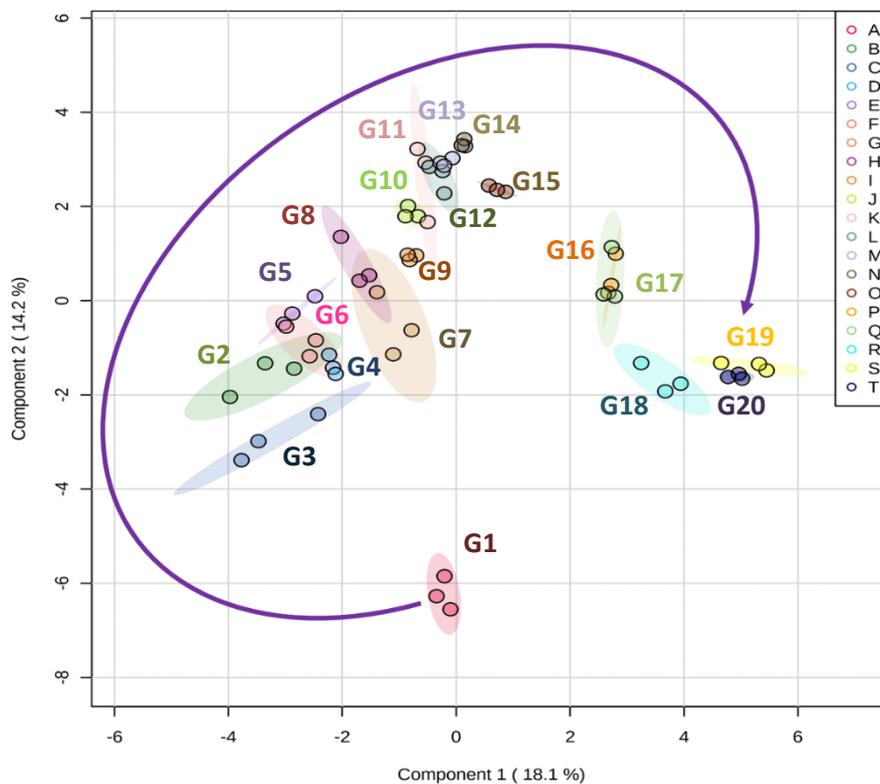


Figura 21: Análisis de componentes principales obtenido a partir de las identificaciones bacterianas a nivel de familia a lo largo del curso del río Guadalquivir y en su estuario.

A continuación, se realizó un análisis de clúster o agrupamientos considerando la abundancia a lo largo del río de las familias identificadas, para lo que se empleó el programa Génesis (Sturn

et al., 2002). Inicialmente el número de familias identificadas fue de 140, un número excesivo para representarlo gráficamente. Para reducir este número, se evaluaron estadísticamente (GraphPad) aquellas familias que mostraban diferencias significativas respecto al punto inicial G1. Así, se determinaron 73 familias que presentaban al menos un punto de muestreo con diferencias significativas, un número que seguía siendo muy elevado. Finalmente, el corte se estableció seleccionando aquellas familias que presentaran diferencias significativas en tres puntos o más, con lo que el número de familias se redujo a 57. Este análisis se encuentra detallado en la Tabla 14 del ANEXO II.

La Figura 22 muestra el análisis de clúster de aquellas familias seleccionadas que mostraron un mayor número de cambios significativos de abundancia a lo largo del curso del río Guadalquivir. Las familias se encuentran organizadas en agrupamientos (A–E) según la tendencia que presentan. Las familias que comprenden el clúster A se encontraban presentes en gran medida en el nacimiento del río (G1) y a medida que el curso del río avanzaba su presencia iba disminuyendo hasta el punto G11, en el cual muchas de las familias presentaron un incremento hasta G18; finalmente, en el estuario (G19–G20) se observó un descenso. En el clúster B, las familias aumentaban en el tramo que iba desde el punto G7 hasta G17. Las familias que componen los agrupamientos C y E mostraron un aumento en la primera mitad del río entre G5–G8 y G2–G7, respectivamente. Por el contrario, las que conforman el clúster D experimentaron un incremento en la última parte del río (G16–G20). Esto puede deberse a que las familias de este clúster son más resistentes a la posible contaminación y, sobre todo, al cambio de salinidad que ocurre en el tramo final del río. Dentro de este último clúster, las familias Coxiellaceae y Rhodospirillaceae se han descrito como patógenos resistentes a desinfectantes y a cambios en el medio. Son taxones que pueden encontrarse tanto en presencia de oxígeno, como en condiciones anaerobias, como es el caso de aguas estancadas y fangos (PATRIC, 2008). Otras familias, como Lactobacillaceae, Pseudomonadaceae y Frankiaceae, podrían provenir de vertidos y escorrentías de procesos agroindustriales que se han ido acumulando a lo largo del curso del río (Cornelis, 2008; UConnecticut, 2011).

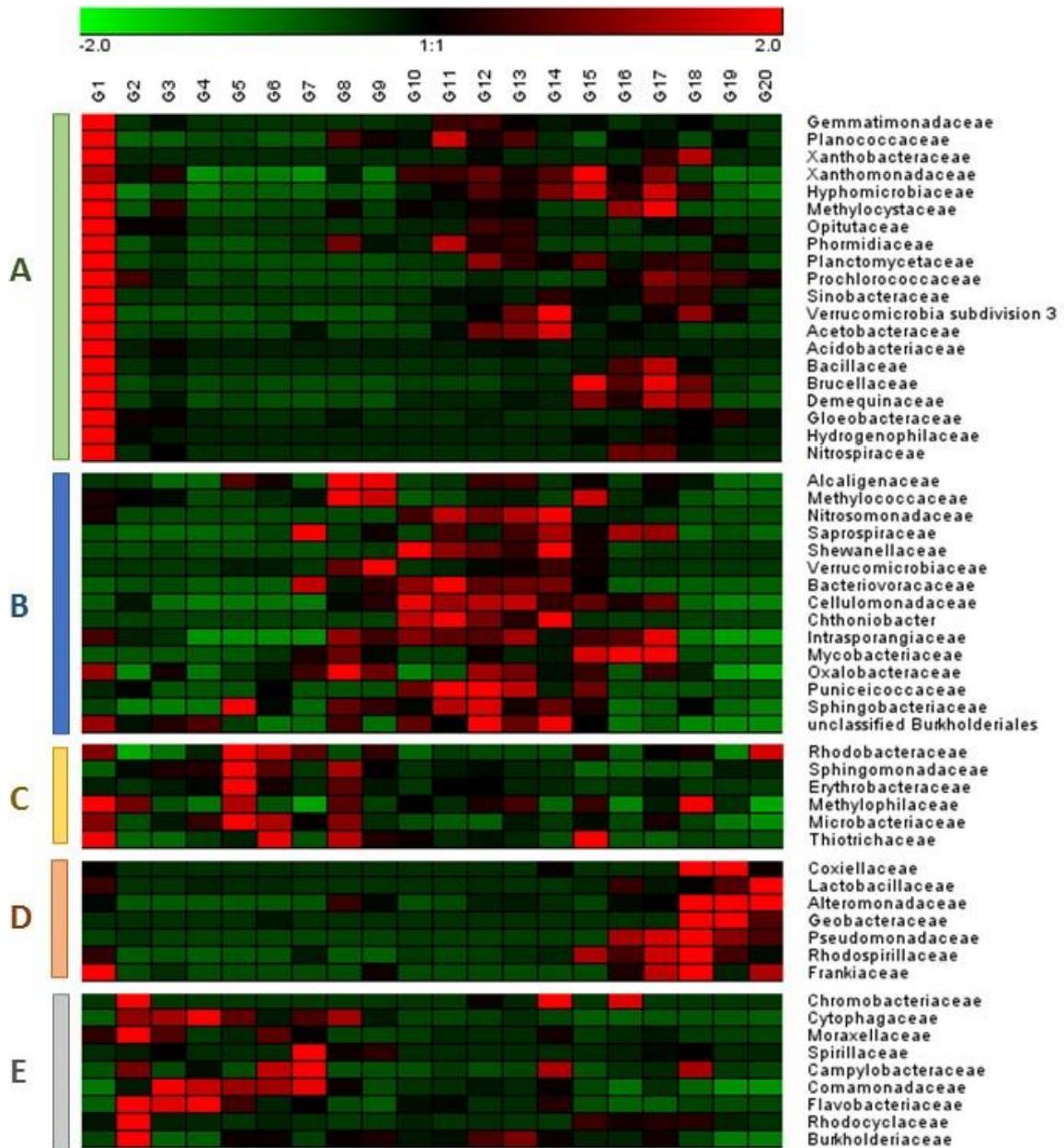


Figura 22: Abundancia relativa de las familias identificadas en aguas a lo largo del curso del río Guadalquivir y su estuario. Agrupamientos obtenidos con el software Genesis (Sturn *et al.*, 2002). Las diferentes familias se encuentran agrupadas en 5 clústeres (A–E). Cada fila representa una familia diferente. Los recuadros verdes indican aquellas muestras con una intensidad menor respecto los otros puntos de muestreo, mientras que los rojos representan niveles superiores. La intensidad de color es proporcional a los colores representados en la escala.

4.3. Análisis de correlaciones de los datos fisicoquímicos y biológicos

Para el análisis de correlaciones se escogieron aquellas variables fisicoquímicas cuyos valores en todos los puntos de muestreo dieron un valor por encima del límite de detección de la técnica empleada. Se estudió la correlación de estas variables entre ellas, con determinaciones biológicas (coliformes totales, *E. coli*) y con el índice de biodiversidad de Shannon-Wiener (Figura 23). Comenzando por las variables fisicoquímicas, es destacable la elevada correlación positiva que hubo entre cationes (sodio, potasio, calcio, magnesio) y aniones (cloruros, sulfatos), y estos con la dureza y la conductividad. Los SST, SSM y SSV se correlacionaban positivamente con la alcalinidad intermedia y la turbidez, y negativamente con el oxígeno disuelto.

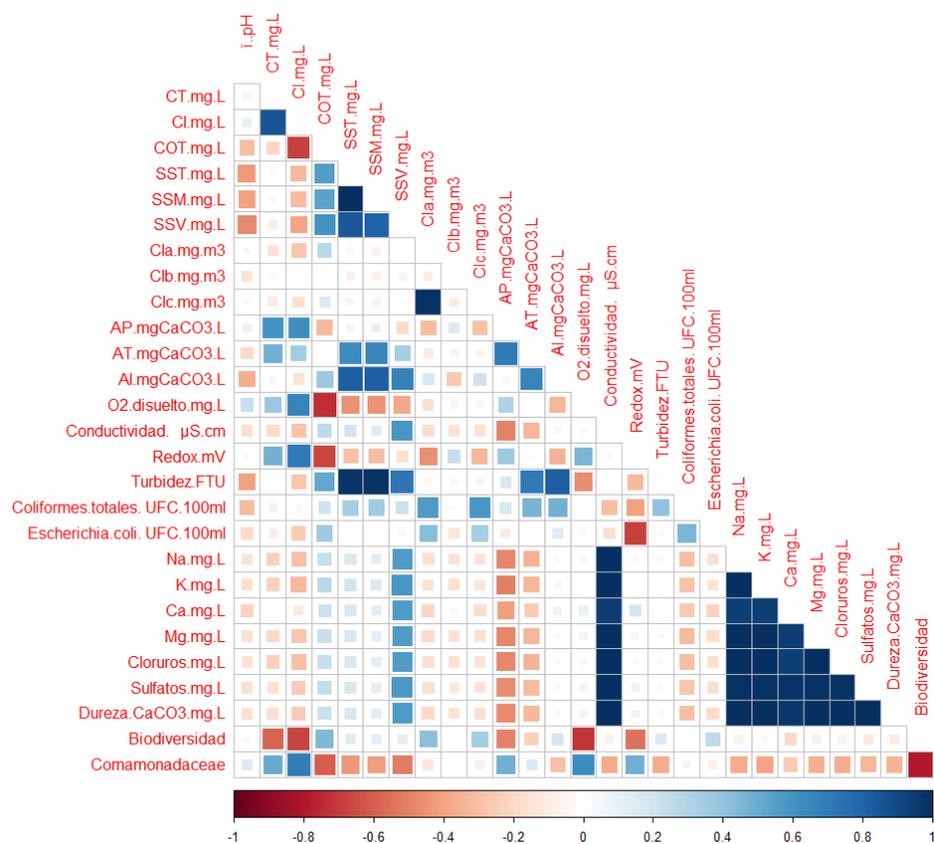


Figura 23: Análisis de correlaciones entre variables fisicoquímicas y biológicas determinadas en el río Guadalquivir.

Respecto a la biodiversidad, se apreció una correlación negativa CT, CI, alcalinidad parcial, oxígeno disuelto y potencial redox. Diversos estudios demuestran que las bacterias consumen carbono del medio en el que se encuentran, lo cual correlaciona el carbono con la biodiversidad, ya que, en aquellos entornos donde hay más bacterias, los niveles de carbono disminuirán a medida que lo van consumiendo; por el contrario, en ambientes donde hay menos presencia de

bacterias que consuman carbono, habrá mayor concentración (Carreira *et al.*, 2021). El pH del río Guadalquivir fue alcalino con un valor promedio $9,35 \pm 1,31$ mg/L. Dado que el rango óptimo de pH para las bacterias debe oscilar entre 6,0 y 8,5, tiene sentido que, a medida que el medio se hace más alcalino, la biodiversidad disminuya (Cervantes-Martínez, 2017). La correlación negativa con el oxígeno disuelto podría explicarse por el filo Proteobacteria, cuya presencia alcanzaba casi el 70%. La mayoría de las familias de este filo son anaerobias, lo cual implicaría que la biodiversidad de familias disminuya a mayores niveles de oxígeno disuelto (Moon *et al.*, 2018). Por último, el potencial redox cuanto más aumentaba más oxidante era el medio. Dado que un entorno oxidante favorece la inhibición del crecimiento de bacterias, esto explica la relación negativa entre el potencial redox y biodiversidad (Imlay, 2019).

En paralelo, también se han correlacionado todas las variables con *Comamonadaceae*, al ser la familia que presentaba más abundancia. Los resultados muestran una correlación positiva con la biodiversidad y el COT, y una correlación negativa con CI y oxígeno disuelto.

5. CONCLUSIONES

Tras una extensa caracterización del río Guadalquivir a lo largo de todo su curso, se ha observado que las zonas más próximas al nacimiento son las más limpias, como indica la caracterización fisicoquímica, y con una mayor diversidad bacteriana. A medida que avanza el curso del río, el índice de calidad de agua va disminuyendo, pasando de una calidad “Buena” entre los puntos G1–G5, a “Regular” en el tramo intermedio (G6–G15), llegando a ser “Mala” en G16 y G17. En los puntos cercanos al estuario, el índice de calidad del agua mejora ligeramente ya que las concentraciones de contaminantes se diluyen, siendo aniones y cationes las únicas variables que presentan un incremento significativo próximo a la desembocadura debido al intercambio de aguas con el océano.

Los picos de niveles altos de contaminantes y otras variables indicadoras de mala calidad del agua se pueden relacionar con actividades de origen antrópico aportadas por afluentes del río principal, como es el caso de la concentración de hierro y cobre (desembocadura del río Guadaira), la presencia de pesticidas (actividades agrarias en el último tramo del río), o la proliferación de bacterias coliformes y de *E. coli* (P.ej.: desembocadura del río Genil).

Por otra parte, el análisis metagenómico ha permitido crear un perfil microbiológico y evaluar los cambios en las comunidades microbianas del río. El filo Proteobacteria ha resultado ser el más representativo (68% de las lecturas totales), destacando dentro de este la familia Comamonadaceae, con una presencia en torno al 34%.

Además, el índice de Shannon-Wiener muestra que los mayores índices de biodiversidad se encuentran en el nacimiento, con descensos a lo largo del cauce del río que pueden asociarse a actividades antrópicas (ya indicadas) que empobrecen la calidad del agua.

Por último, relacionando variables fisicoquímicas y biológicas, se observa una correlación negativa entre la biodiversidad y carbono total e inorgánico, alcalinidad parcial, O₂ disuelto y potencial redox, lo cual puede ser de gran utilidad a la hora de profundizar en el estudio de un ecosistema tan complejo y relevante como el río Guadalquivir.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abd-Alla, M. H., El-Enany, A. W. E., Nafady, N. A., Khalaf, D. M., & Morsy, F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological research*, 169(1), 49-58.

Agudelo, R. M. (2005). El agua, recurso estratégico del siglo XXI. *Facultad Nacional de Salud Pública*, 23(1). Obtenido de <https://revistas.udea.edu.co/index.php/fnsp/article/view/522>

Albarrán-Zavala, E. (2008). El potencial redox y la espontaneidad de las reacciones electroquímicas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 2(3), 32.

American Public Health Association (APHA). (1989). *Standard Methods for examination of water and wastewater* (17 ed.).

Angulo Reyes, R. (2015). Estudio Diagnóstico de la Ecotoxicidad de Afluentes del Río Guadalquivir, en el área comprendida entre Las Tipas y El Angosto de San Luis, Provincia Cercado. *Acta Nova*, 7(1), 28-46. Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-07892015000100002&lng=es&tlng=es

Anta, J., Cagiao, J., Suárez, J., & Peña, E. (2009). Análisis de la movilización de sólidos en suspensión en una cuenca urbana separativa mediante la aplicación del muestreo en continuo de la turbidez. *Ingeniería del Agua*, 16(3), 8.

Barceló, D., & López de Alda, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes 1-3.

Bisutti, I., Hilke, I., & Raessler, M. (2004). Determination of total organic carbon—an overview of current methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 716-726.

Boyd, A. (2018). Am I Missing Something? A Look into the Dangers of Viable but Nonculturable Cells (VBNC). *Luminultra* 1-5.

Campo, A. M., & Duval, V. S. (2014). Diversidad y valor de importancia para la conservación de la vegetación natural. Parque Nacional Lihué Calel (Argentina). *Anales de Geografía*, 34(2), 25-42.

Carreira, C., Talbot, S., & Lønborg, C. (2021). Bacterial consumption of total and dissolved organic carbon in the Great Barrier Reef. *Springer*, 154(8), 10-12.

Castro, G., Ramil, M., Cela, R., & Rodríguez, I. (2021). Assessment of UV combined with free chlorine for removal of valsartan acid from water samples. *PubMed*, 762, 1-2.

Cervantes-Martínez, J., Orihuela-Equihua, R., & Rutiaga-Quñones, J. G. (2017). Acerca del Desarrollo y Control de Microorganismos en la Fabricación de Papel. *Conciencia Tecnológica* (54), 1-9.

Chaturvedi, S., & Dave, P. (2012). Removal of iron for safe drinking water. *Elsevier*, 303, 1-11.

Confederación Hidrográfica del Guadalquivir. (2014). Memoria de actividades 2014, 20-35.

Confederación Hidrográfica del Guadalquivir. (2019). La CHG finaliza la restauración del cauce del río Corbones a su paso por Puebla de Cazalla. *Iagua*, 1.

Confederación Hidrográfica del Guadalquivir. (2022). Demarcación hidrográfica del Guadalquivir: Tercer Ciclo (2022-2027), 20-263.

Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, 1.

- Cortés-López, N., Montor-Antonio, J., Olvera-Carranza, C., Peña-Castro, J., & del Moral-Ventura, S. (2014). Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2-15.
- Da Silva, A. (2018). El río Manzanares en su paso por los tejidos urbanos de Madrid: el juego de posibilidades entre una biofilia hídrica cotidiana y la recuperación ecológica riparia. 20-39.
- Davies-Colley, R. J., & Smith, D. G. (2001). Turbidity suspeni) ed sediment, and water clarity: a review 1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 37(5), 1085-1101.
- Ecologistas en acción. (2004). Vertidos de "Cobre las Cruces" al estuario del Guadalquivir, 1.
- Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition research*, 27(1), 1-12.
- Fondriest Environmental, Inc. (2013). pH of Water. *Fundamentals of Environmental Measurements*. Obtenido de <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/ph/>
- García, E. (2018). Corbones, el río moribundo. *elCorreo*, 1.
- Glez, A. (2019). Una empresa de aderezo es absuelta porque todas las viviendas vierten residuos. *Diario de Sevilla*, 1.
- Greenpeace. (2005). Agua. La calidad de las aguas en España. Un estudio por cuencas, 1.
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environ Microbiol*, 21(2), 521-530.
- Joseph, L., Jun, B. M., Flora, J. R., Park, C. M., & Yoon, Y. (2019). Removal of heavy metals from 59áter sources in the developing world using low-cost materials: A review. *Chemosphere*, 229, 142-159.
- Kurokawa, K., Tani, K., Ogawa, M., & Nasu, M. (2002). Abundance and distribution of bacteria carrying sltII gene in natural river water. *Sfam*, 28(5), 10-405.
- Lucena, H. (2016). Análisis de la biodiversidad microbiana asociada a la fermentación de aceitunas verdes de mesa por técnicas moleculares dependientes e independientes de. 2-6.
- Lyman, J., & Fleming, R. H. (1940). Composition of sea water. *J. mar. Res*, 3(2), 134-146.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., & Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria 1. *Journal of phycology*, 38(1), 17-38.
- Manrique, P. (2021). Potencial redox para la desinfección del agua de bebida. *nutrofeed*.
- Margolles Barros, A., Bargiela Bargiela, R., Blanco-Míguez, A., Correig Blanchar, X., D'Amato, M., D'Auria, G., Suárez Fernández, J. E. (2020). Técnicas ómicas aplicadas al estudio de la microbiota. *SEMiPyP*, 63-72.
- Michán, C., Blasco, J., & Alhama, J. (2021). High-throughput molecular analyses of microbiomes as a tool to monitor the wellbeing of aquatic environments. *Microb Biotechnol*, 14(3), 870-885.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2013). Análisis de los procesos de desertificación en España en función de los distintos escenarios climáticos.
- Montaño, N., Sandoval, L., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. 15-23.

Moon, C. D., Young, W., Maclean, P. H., Cookson, A. L., & Bermingham, E. N. (2018). Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiologyopen*, 7(5), 1-20.

Muñoz, J. M. (2020). Representantes de Podemos, en el Genil, con mucha espuma en el agua. *El Independiente de Granada*, 1.

Naciones Unidas. (1992). Agenda 21. Obtenido de <https://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/index.htm>

Orenda Technologies. (2022). CO₂ y el pH: La ley Henry, 1-5.

Osiroff, A. P., Kahl, L. C., Valla, D., & Bianchi, A. A. (2015). Sistema del carbono en el Océano Atlántico Sudoccidental. Distribuciones de Alcalinidad y Carbono Inorgánico disuelto en el Océano Atlántico Sudoccidental. Conferencia: IX Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar.

Paruch, L., Paruch, A. M., Eiken, H. G., & Sørheim, R. (2019). Faecal pollution affects abundance and diversity of aquatic microbial community in anthropo-zoogenically influenced lotic ecosystems. *Scientific reports*, 9.

PathoSystems Resource Integration Center (PATRIC). (2008). Coxiella. Obtenido de <https://web.archive.org/web/20080102121023/http://patric.vbi.vt.edu/organism/overview.php?organismId=2>

Payus, C., & Nandini, U. (2014). The presence of totalcoliform and fecal coliform in the private beach resort of Sabah. *ResearchGate*, 34, 1-5.

Peña, E. (2007). Calidad del agua: Trabajo de investigación, oxígeno disuelto (OD), 1-17.

Pereira, V. J., Marques, R., Marques, M., Benoliel, M. J., & Crespo, M. B. (2013). Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. *Water research*, 47(2), 517-523.

Piedrahita, J. (2018). Análisis del índice de calidad del agua (ICA) e índice de contaminación de agua (ICOS) en Quebrada Villa ubicada en El Bagre, Antioquia, 2-9.

Pizá, C. (2018). El Guadalquivir tensa la ampliación de la mina Las Cruces: depurar el agua sale caro. *Cotizalia*, 1.

Queralt Torrell, R. (2000). Hidrograma para la representación de la calidad y contaminación de las aguas subterráneas. *Dialnet*(197), 20-29.

Red hidrometeorológica de Bizkaia (RHB). (2022). Equipamiento físico químico de las aguas.

Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (PRTR). (2007). Diurón. Obtenido de <https://prtr-es.es/Diuron,15624,11,2007.html>

Rejón, R. (2021). Las Cruces, la mina de cobre que batía récords de beneficios mientras esquilmba un acuífero. *elDiario*, 1.

Rincón, R. (2007). El Gobierno central sanciona a Morón con 600.000 euros por vertidos tóxicos. *El País*, 1.

Rock, C., & Rivera, B. (2014). La Calidad del Agua, E. coli y su Salud. 1-5.

Rodicio, M. d., & Mendoza, M. d. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4), 238-245.

- Rodríguez, J. (2009). Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto, (ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, nov 2008. *Revista Pensamiento Actual*, 9(12-13), 125-134.
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2019). DNA Next-Generation Sequencing (NGS): Present and Future in Clinical Practice. *Javeriana*.
- Rubio-Guerri, C., Vicente-Rubiano, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2020). Metagenómica, la técnica que “descubre” nuevos virus. 1-4.
- Salas Ostalé, M., Benito Galindo, S. M., Pérez Bona, A., del Amo Arregui, C., Ormazabal Cundin, C. M., & Hidalgo De La Cruz, M. (2022). Secuenciación de bacterias ARNR 1S. *Revista Sanitaria de Investigación*, 1-3.
- Santa Marina, L., Ayerdi, M., Lertxundi, A., Basterretxea, M., Goñi, F., Iñaki Alvare, J., Ibarluzea, J. M. (2010). Trihalomethane and haloacetic acid concentrations in drinking water and their estimated intake during pregnancy in the INMA cohort (Guipúzcoa, Spain). *SciElo*, 8-321.
- Sarrión, S. (2022). Colectivos ecologistas de Granada temen por el proyecto de renaturalización del río Genil. *elSaltoDiario*, 1.
- Segata, N., Boernigen, D., Timothy L, T., Morgan, X., Garrett, W., & Huttenhower, C. (2013). Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular systems biology* 14(9), 1-20.
- Sheikhi, R., Alimohammadi, M., Askari, M., & Moghaddasian, M. S. (2014). Decay of Free Residual Chlorine in Drinking Water at the Point of Use. *PubMed*, 43(4), 535-536.
- Shiklomanov, I., & Rodda, J. (2003). *World Water Resources at the Beginning of the 21s Century*. Wallingford: Cambridge University Press, 38-45.
- Sigler, A., & Bauder, J. (2017). Alcalinidad, pH y Sólidos Disueltos Totales, 1-3.
- Sturn, A., Quackenbush, J., & Trajanoski, Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 18, 207-208.
- Suárez-Obando, F. (2014). Metabolómica un nuevo enfoque del diagnóstico de enfermedades neuromusculares. *ResearchGate*, 1-27.
- Swistock, B., & Sharpe, W. (2016). Coliform Bacteria. *PennState Extension*, 1-3.
- Tasca, A. L., Puccini, M., & Fletcher, A. (2018). Terbutylazine and desethylterbutylazine: Recent occurrence, mobility and removal techniques. *Chemosphere*, 202, 94-104.
- Thorsten, K., Sanz, J. L., Galdino, L., Florencio, L., & Kato, M. T. (Marzo de 2017). Impact of pollution on the microbial diversity of a tropical river in an urbanized region of northeastern Brazil. *PubMed*, 20(1), 11-24.
- Torres, P., Hernán, C., & Janeth, P. (2009). Índices de calidad de agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano. Una revisión crítica. *Ingenierías*. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4845739>
- Trujillo, E., Martínez-Miranda, V., & Flores, N. (2008). Ajuste del Equilibrio Químico del Agua Potable con Tendencia Corrosiva por Dióxido de Carbono. *ResearchGate* 19(6), 89-101.
- Tyagi, S., Sharma, B., Singh, P., & Dobhal, R. (2013). Water Quality Assessment in Terms of Water Quality Index. *American Journal of Water Resources*, 1(3), 34-38. doi:10.12691/ajwr-1-3-3

- UCO & EVREN. (2015). System of Water Accounting in Guadalquivir River Basin, 1-82.
- UConnecticut. (2011). Frankia Taxonomy.
- UNESCO. (2006). The United Nations World Water Development Report 2: water a shared responsibility. Obtenido de <https://digitallibrary.un.org/record/3894442?ln=es#record-files-collapse-header>
- Verberk, W. C., Bilton, D. T., Calosi, P., & Spicer, J. I. (2011). Oxygen supply in aquatic ectotherms: partial pressure and solubility together explain biodiversity and size patterns. *Ecology*, 92(8), 1565-1572.
- Wang, B., Zheng, X., Zhang, H., Xiao, F., He, Z., & Yan, Q. (2020). Keystone taxa of water microbiome respond to environmental quality and predict water contamination. *Environmental Research* 187, 3-23.
- Waterboards. (2010). Folleto Informativo Amoniaco, 1.
- Willems, A. (2014). The Family Comamonadaceae. Springer, 777-851. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_238
- WRC. (2022). Water Research Center. Obtenido de Water Quality Index Calculator for Surface Water: <https://www.knowyourh2o.com/outdoor-3/water-quality-index-calculator-for-surface-water>
- Wurts, W. A. (2002). Alkalinity and hardness in production ponds. *WORLD AQUACULTURE-BATON ROUGE*-, 33(1), 16-17.
- Xue, X., Jia, J., Yue, X., Guan, Y., Zhu, L., & Wang, Z. (2021). River contamination shapes the microbiome and antibiotic resistance in sharpbelly (*Hemiculter leucisculus*). *Environmental Pollution*, 268, 13-40.
- Yu, W., Hua-Fang, S., Yan, H., Jin-Ya, W., Yun-Xia, J., Nora Fung-Yee, T., & Hong-Wei, Z. (2012). Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater, Intertidal Wetland, and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. *PubMed*, 9-34.
- Zamora, J. R. (2009). Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto, (ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre. *Pensamiento Actual*, 9(12), 125-134.
- Zamora, O., Montaña, J. M., Galindo, V. B., Siebe, C., & Prado, B. L. (2016). Determinación simultánea de cationes mayoritarios en muestras de agua residual por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica. *SciELO*, 1-32.
- Zebo, F., Bin, S., Dong-Dong, X., & Liao-Yuan, Y. (2017). Study on pH value and its variation characteristics of the main rivers into Dianchi lake under the anthropogenic and natural processes, Yunnan, China. *Journal of Information and Optimization Sciences*, 38(7), 1197-1210.
- Zhang, X., Li, L., Butcher, J., Stintzi, A., & Figeys, D. (2019). Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *BMC*, 268, 1-12.

ANEXO I

Tabla 11: Variables fisicoquímicas y microbiológicas empleadas por diferentes Índices de calidad del agua (ICA) (Torres *et al.*, 2009).

País	Estados Unidos		UNEP-GEMS		Unión Europea	España	Brasil		Colombia		Frec*
	ICA NSF 1970	ICA Dinius 1987	DWQI		UWQ 12007	ISQA 1982	IAP		ICA Rojas 1991	ICAUCA 2004	
HWQ 12007			AWQ 12007	IQA 1975			ISTO 2002				
Parámetro											
OD	X	x			x	x	x		x	x	0.70
pH	X	x		x	x		x		x	x	0.70
DBO	X	x			x		x		x	x	0.60
Nitratos	X	x	x		x						0.50
Coliformes Fecales	X	x					x		x	x	0.50
Temperatura	X	x				x	x				0.40
Turbiedad	X						x		x	x	0.40
Sólidos Disueltos Totales	X						x		x	x	0.40
Fósforo Total					x		x			x	0.30
Cadmio			x		x			x			0.30
Mercurio			x		x			x			0.30
Conductividad		x				x					0.20
Sólidos Suspendidos						x				x	0.20
Color		x								x	0.20
Nitrógeno Total							x			x	0.20
Cloruros		x		x							0.20
Plomo			x					x			0.20
Cromo Total			x					x			0.20
Arsénico			x		x						0.20
Fluoruro			x		x						0.20
Manganeso			x					x			0.20
Zinc				x				x			0.20
Coliformes Totales		x			x						0.20
DQO						x					0.10
Alcalinidad		x									0.10
Dureza		x									0.10
Nitritos			x								0.10
Amoniac				x							0.10
Fosfatos	X										0.10
Sodio				x							0.10
Sulfatos				x							0.10
Hierro				x							0.10
Cobre			x								0.10
Boro			x								0.10
Niquel								x			0.10
Cianuro					x						0.10
Selenio					x						0.10
PFTHM								x			0.10
Aluminio Disuelto								x			0.10
Cobre disuelto								x			0.10
Hierro Disuelto								x			0.10
COT						x					0.10
Total Parámetros	9	12	18		12	5	20		6	10	

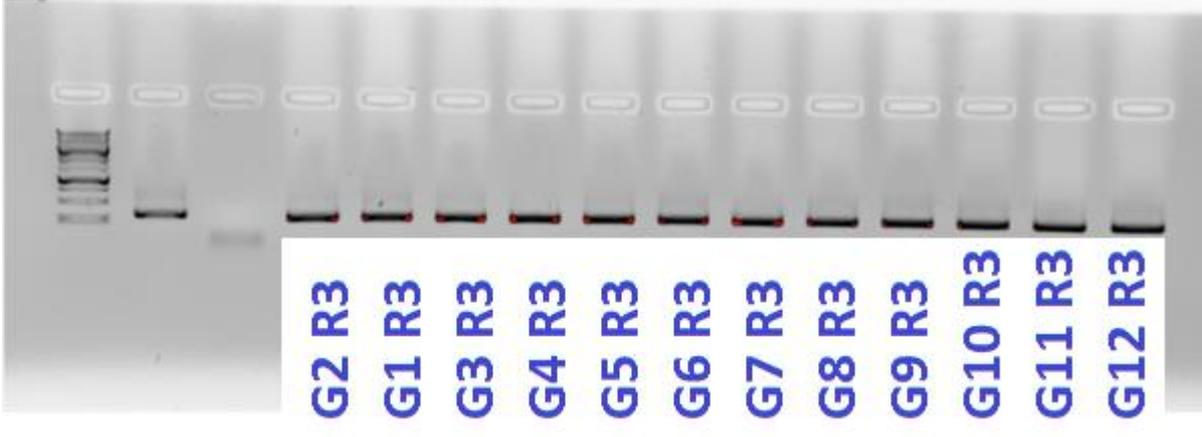
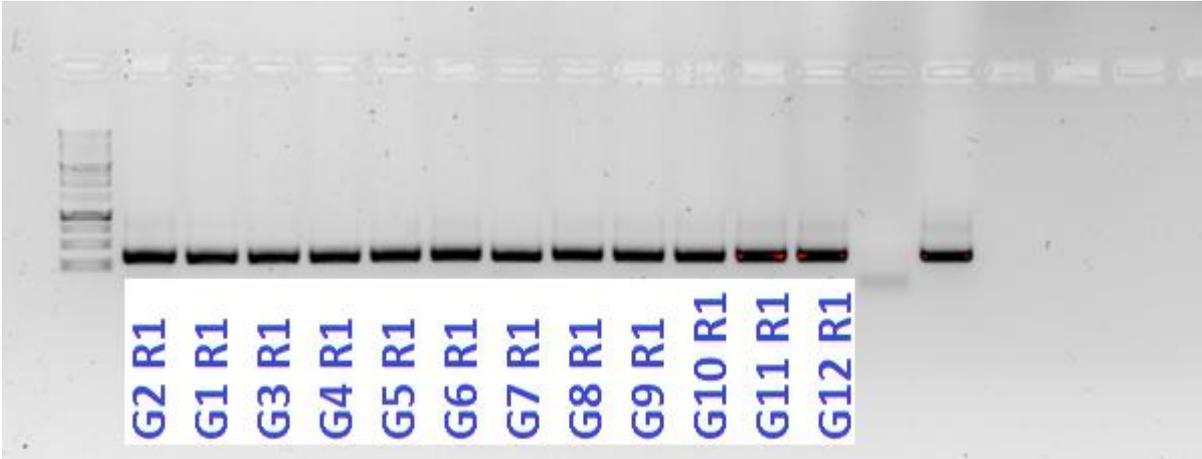
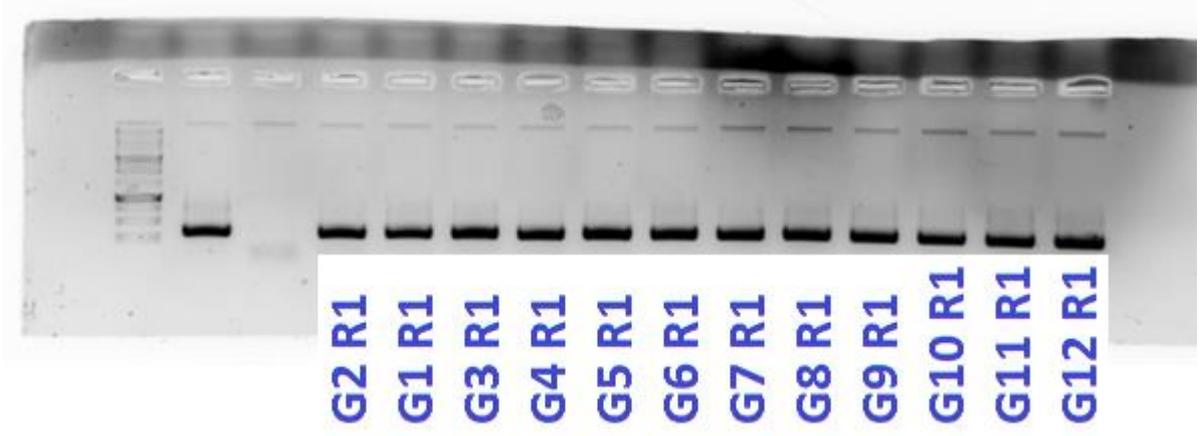
Tabla 12: Pesos relativos asignados a las variables que conforman los ICA (Torres *et al.*, 2009).

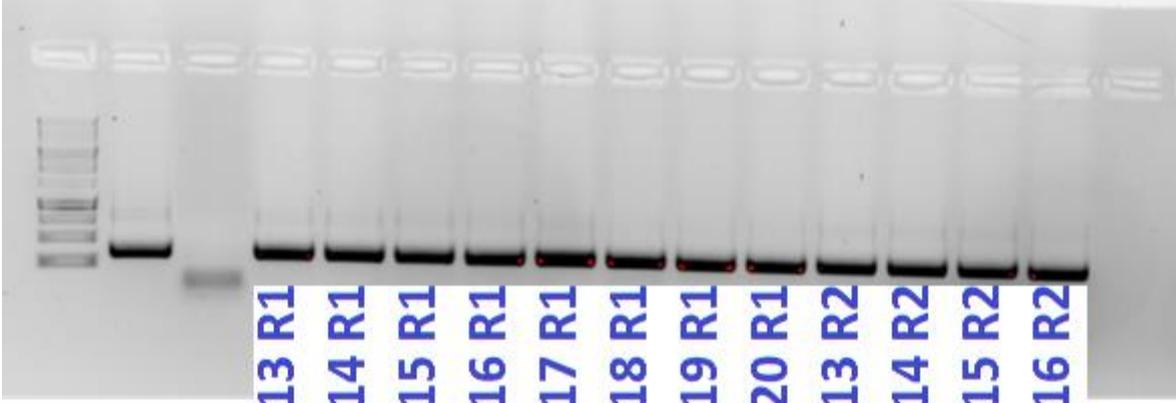
País	Estados Unidos		Unión Europea	Colombia	
	ICA NSF 1970	ICA Dinius 1987	UWQI 2007	ICA Rojas 1991	ICAUCA 2004
Parámetro					
OD	0.17	0.109	0.114	0.25	0.21
pH	0.11	0.077	0.029	0.17	0.08
DBO	0.11	0.097	0.057	0.15	0.15
Nitratos	0.10	0.09	0.086		
Coliformes Fecales	0.16	0.116		0.21	0.16
Temperatura	0.10	0.077			
Turbiedad	0.08			0.11	0.07
Sólidos Disueltos Totales	0.07			0.11	0.07
Fósforo Total			0.057		0.08
Cadmio			0.086		
Mercurio			0.086		
Conductividad		0.079			
Sólidos Suspendidos					0.05
Color		0.063			0.05
Nitrógeno Total					0.08
Cloruros		0.074			
Arsénico			0.113		
Fluoruro			0.086		
Coliformes Totales		0.09	0.114		
DQO					
Alcalinidad		0.063			
Dureza		0.065			
Fosfatos	0.10				
Cianuro			0.086		
Selenio			0.086		

Tabla 13: Calificaciones de la calidad del agua (Piedrahita, 2018).

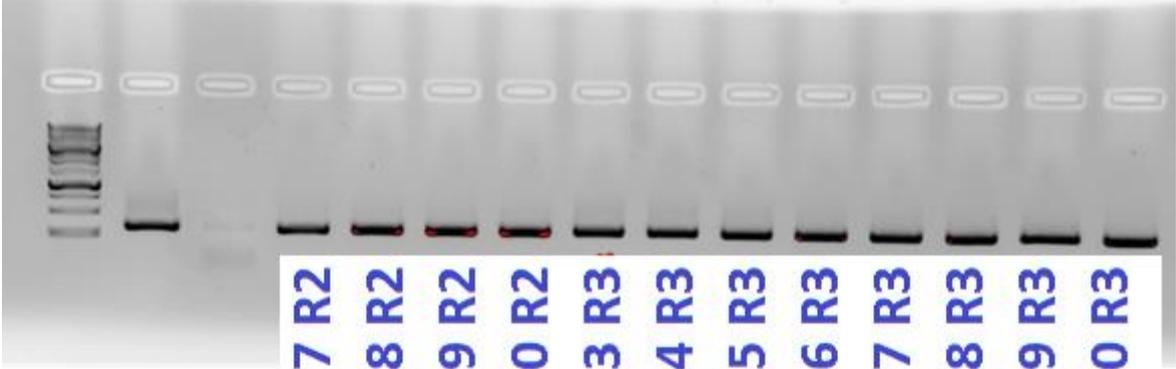
Calificación de la calidad del agua	Categorías de valores que puede tomar el indicador	Color
Buena	0,91-1,00	Azul
Aceptable	0,71-0,90	Verde
Regular	0,51-0,70	Amarillo
Mala	0,26-0,50	Naranja
Muy Mala	0,00-0,25	Rojo

ANEXO II: Visualización de los productos de la PCR tras electroforesis en gel de agarosa. Se muestran distintas réplicas (R1-R3) de los distintos puntos de muestreo (G1-G20).





G13 R1
G14 R1
G15 R1
G16 R1
G17 R1
G18 R1
G19 R1
G20 R1
G13 R2
G14 R2
G15 R2
G16 R2



G17 R2
G18 R2
G19 R2
G20 R2
G13 R3
G14 R3
G15 R3
G16 R3
G17 R3
G18 R3
G19 R3
G20 R3

Tabla 14: Familias con diferencias significativas de abundancia en los distintos sitios del río Guadalquivir respecto al punto inicial (G1). A la derecha se muestran las agrupaciones (clúster, A-E) donde se incluye cada grupo de familias, que coinciden con los mostrados en la Figura 25.

Familias	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20
Gemmatimonadaceae	**	*	*	*	*	*	*	*	*			**	*		*	*	*	*	*
Planococcaceae		*														*			*
Xanthobacteraceae	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Xanthomonadaceae											***	***	***	***			***	***	***
Hyphomicrobiaceae	*	*	*								**	*				*			*
Methylocystaceae	**	**	**	**		*		**					*	**		*	**	**	**
Opitutaceae			*	*	*	*	**	*					**	*	*		**	*	*
Phormidiaceae	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	*		**	**	**	**	**	**	**
Planctomycetaceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**								**	*	**
Prochlorococcaceae		**	**	*	**	**	**	**	**	**		*	**	**					**
Sinobacteraceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**	***		*	**	*	**		*		**
Verrucomicrobia sub. 3	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*		*			***	**
Acetobacteraceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	*			**	*	*	*	*	**
Acidobacteriaceae	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Bacillaceae	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**
Brucellaceae	**	*	*	*	**	*	**	*	*									*	*
Demequinaceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*		**	**		*				**
Gloeobacteraceae	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**
Hydrogenophilaceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	*	*	**
Nitrospiraceae	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Alcaligenaceae	**						*	*			*	*						**	**
Methylococcaceae			**	**	**											**		**	**
Nitrosomonadaceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*		**	**	**
Saprosiraceae												***	***	***		***			
Shewanellaceae	***																		***
Verrucomicrobiaceae				***			***	***				***	***	***	***	***			
Bacteriovoraceae												***	***	***					
Cellulomonadaceae		*	*					*	*		**	*		*		*		***	***
Chthoniobacter									***	***	***	***	***	***					
Intrasporangiaceae									***	***	***	***	***	***	***	***			
Mycobacteriaceae							***	***			***	***	***	***	***	***	***		
Oxalobacteraceae			**				*				**	*							*
Puniceococcaceae					*		*	*		*									
Sphingobacteriaceae				***						***	***	***	***	***					
Unc. Burkholderiales						*									*	**		*	*
Rhodobacteraceae			***	*	*		*				**	*	*	**		*			**
Sphingomonadaceae		*	*	*							*								
Erythrobacteraceae		*				*		*					*	*	*	*	*	*	*
Methylophilaceae	**		*								*	**	*	*		*			***
Microbacteriaceae	*	*	*			*	*	*	*		*							*	**
Thiotrichaceae	**	*	*	*	*	*	*	*	*	**	**	**	**	**	**	**	*	*	*
Coxiellaceae	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*			*
Lactobacillaceae	*	*				*	*	*	**	*	*	*	*						*
Alteromonadaceae	*	*	*	*	*	*		*	*		*	**			*	*			*
Geobacteraceae																	*	*	**
Pseudomonadaceae								**								**		*	*
Rhodospirillaceae	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*						*
Frankiaceae																***	***		***
Chromobacteriaceae		***											***	***					
Cytophagaceae	***	***	***	***	***		***		***	***	***	***	***	***					
Moraxellaceae			**				**	**	**	*	*	**	**	**			**	**	**
Spirillaceae	***						***	***											
Campylobacteraceae		***	***		***	***						***	***		***	***	***		
Comamonadaceae	*	*	**	*	*	*	*		*		*	***	*			**		*	**
Flavobacteriaceae	**	*	*	*	*								*				*		
Rhodocyclaceae	*	**					*	*					*	*		*			
Burkholderiaceae		*	*													*		***	**

A

B

C

D

E