



**Universidad del
Rosario**



Caracterización Genómica de Especies de Clostridiales Circulantes en el Río Pasto

Juan Diego Fernández Sánchez

**Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Bogotá, Colombia
2024**

Caracterización Genómica de Especies de Clostridiales Circulantes en el Río Pasto

Juan Diego Fernández Sánchez

**Trabajo de grado para obtener el título de:
Biólogo**

**Directora:
Marina Muñoz Díaz, Ph.D**

**Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Universidad del Rosario
Bogotá D.C, Colombia
2024**

Caracterización Genómica de Especies de Clostridiales Circulantes en el Río Pasto

Juan Diego Fernández¹, Juan David Ramírez^{1,2} y Marina Muñoz^{1,3*}

¹ Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

² Molecular Microbiology Laboratory, Department of Pathology, Molecular and Cell-Based Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States.

³ Instituto de Biotecnología-UN (IBUN), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

* Corresponding author: cmmunozd@unal.edu.co

RESUMEN

La clase Clostridia está compuesta por bacterias con diversos roles potenciales, contando con especies comensales y otras patógenos oportunistas. Estas bacterias son clasificadas como anaerobias y están presentes a nivel intestinal de humanos y animales; sin embargo, la alta resistencia de sus esporas al oxígeno les permite ampliar su rango de dispersión, siendo encontrados en muestras ambientales de suelos y aguas. La presencia de este tipo de microorganismos en cuerpos de agua puede ser un marcador de pérdida de su calidad. Zonas en las que es frecuente el contacto entre poblaciones humanas y cuerpos hídricos pueden ser propensas a contaminación de diferentes tipos, siendo una de ellas los microorganismos, muchos de los cuales son de importancia clínica por su potencial patógeno. Este estudio tuvo como objetivo detectar y caracterizar a nivel genómico bacterias Clostridiales aisladas de muestras de agua, tomadas entre septiembre del 2022 hasta marzo del 2023 del Río Pasto. Para el proceso de caracterización se ensamblaron Genomas Metagenómicos Ensamblados (MAGs) en los cuales se identificaron marcadores de resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia, siendo esto tema relevante de salud pública. Se ensamblaron 33 MAGs de alta calidad y cuatro de calidad media, correspondientes a 11 especies clostridiales, estando entre estas *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* y *Clostridioides difficile*, que son medicamente relevantes. *Pymaioacter missiliensis* y

Clostridium sulfidigenes, también fueron detectadas en este estudio fueron, siendo especies Clostridiales recientemente descritas y poco estudiadas, por lo que no es claro su impacto sobre hospederos. La búsqueda de factores de virulencia a partir de los MAGs mostró la presencia de genes *nag*, junto con otros genes de este tipo frecuentes en *C. perfringens*. Adicionalmente, se encontraron marcadores de resistencia a antibióticos, especialmente asociados a resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, lincosamidas, péptidos y tetraciclinas, ampliamente distribuidos en los MAGs obtenidos. En este estudio se identificó la presencia de 11 especies Clostridiales en cuerpos de agua, las cuales transportan factores de virulencia y marcadores de resistencia, revelando un riesgo microbiológico en el río Pasto.

Palabras clave: Clostridiales, Patógenos, Marcadores de resistencia microbiana, Factores de Virulencia.

ABSTRACT

The Clostridia class comprises bacteria with diverse roles, including commensal species and opportunistic pathogens. These bacteria are classified as anaerobic and are present in the gut of animals, including humans. Their spores are highly oxygen resistant, allowing them to expand their distribution in environmental samples such as soil and water. The presence of these bacteria in water bodies is an indicator of low quality, and areas of frequent contact between humans and water bodies are prone to multiple sources of contamination, including microorganisms. In particular, the presence of Clostridia in water is clinically relevant due to its pathogenic potential. This study aimed to detect Clostridial bacteria from water samples collected in the Pasto River between September 2022 and March 2023 and characterize them at the genomic level. We assembled Metagenome-Assembled Genomes (MAGs) in which we identified antimicrobial resistance markers and virulence factors, making this a relevant public health study. A total of 33 high-quality and four medium-quality MAGs were assembled, corresponding to 11 species of these bacteria, including *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, and *Clostridioides difficile*, which are medically relevant clostridial species. Notably, we detected the presence of the rarely reported species *Pymaio bacter missiliensis* and *Clostridium sulfidigenes*, both recently described Clostridial species that are poorly studied and for which there are no reported infections.

Among the virulence factors identified were *nag* and related genes frequently found in strain 13 of *C. perfringens*. We also detected antibiotic-resistance markers associated with fluoroquinolones, aminoglycosides, lincosamides, peptides, and tetracyclines in the MAGs assembled. This study identified 11 Clostridial species in water bodies, which carry virulence factors and resistance markers, revealing a microbiological risk in the Pasto River.

Key words: Clostridials, Pathogens, Antimicrobial Resistance Markers, Virulence Factors.

1. INTRODUCCIÓN

La ubicuidad de las bacterias en la biosfera lleva a su diversa distribución en múltiples nichos, con una alta diversidad funcional y roles ecológicos que van desde la producción primaria de biomasa (fijando CO₂), hasta su rol como saprofitos, reciclando elementos esenciales al degradar materia orgánica (Gupta et al., 2016). A pesar de su amplia distribución, la mayoría de las especies de este dominio aún se desconocen dada la dificultad de cultivo, ya que solo el 1 al 10% de las bacterias son cultivables en el laboratorio (Kellenberger, 2001).

La clase bacteriana Clostridia se caracteriza por ser bacilos, mayoritariamente Grampositivos, anaerobios estrictos, presente en el microbioma gastrointestinal normal de muchos animales, y formadores de endosporas, cuya resistencia hace posible encontrarlos en muestras de suelo y agua (Wells & Wilkins, 1996; Setlow, 2014). Esto les permite sobrevivir incluso en presencia de oxígeno, a altas temperaturas y luego de desinfección química, lo que en conjunto facilita su dispersión a múltiples ambientes, como cuerpos de agua (Kator & Rhodes, 2003). Los Clostridiales tienen múltiples funciones ecológicas y enzimas que les hacen candidatos para ser utilizados en la producción de biocombustibles; por ejemplo, las cepas ATCC 13124 de *C. perfringens* y DSM525 de *C. pasteurianum* son uno de los mayores productores de biohidrógeno (Zhang et al., 2019; Mazzoli et al., 2024), y han llegado a ser contempladas para procesos de desarrollo de tecnologías sostenibles. Sin embargo, la alta plasticidad del genoma de los Clostridiales los ha convertido en un grupo importante por el rol patógeno de varias de las especies que lo conforman. Especies de este grupo causan enfermedades como el botulismo (*Clostridium botulinum*), el tétano (*Clostridium tetani*), la gangrena gaseosa (*Clostridium perfringens*), así como la colitis

pseudomembranosa, el megacolon tóxico y la diarrea asociada a uso de antibióticos (*Clostridioides difficile*), el cual es, adicionalmente, uno de los patógenos intrahospitalarios más comunes (Magill et al., 2014). La capacidad de colonizar un amplio rango de nichos, y como heterogeneidad de interacciones ecológicas, como comensales o patógenos, varios de ellos con elevada relevancia clínica, han promovido el uso de enfoques One Health, con el objetivo de realizar un análisis integrado del impacto en salud humana, animal, y medioambiental., que pueda conducir a la identificación de reservorios de estos microorganismos, así como recursos abióticos que podrían conformar cadenas de transmisión, siendo una de las herramientas más informativas para este tipo de estudios el análisis de recursos genómicos (Cersosimo, 2024).

A causa de la presencia natural de los Clostridiales en suelo y microbioma intestinal de animales, se ha sugerido que su presencia en cuerpos de agua es indicador de contaminación fecal. Así, por ejemplo, la presencia de esporas de *C. perfringens* se usa como indicador de la eficiencia de procesos de cloración y de contaminación por fuentes sin clorar (Kator & Rhodes, 2003). Diversas técnicas han sido utilizadas para detectar e identificar microorganismos. El cultivo *in vitro* es una metodología clásica que permite determinar la viabilidad del microorganismo, su susceptibilidad a antibióticos, y su cultivo en laboratorio para investigación (Suchodolski, 2013). Sin embargo, esta metodología tiene la gran limitante de que sólo entre el 1-10% de las especies bacterianas son cultivables en el laboratorio (Zhang et al., 2021). Debido a esto, en las últimas décadas se ha optado por el uso de técnicas moleculares para la detección de virus, bacterias y protozoarios, siendo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) una técnica de preferencia por ser muy sensible y capaz de detectar microorganismos incluso cuando están presentes en bajas cantidades (Botes et al., 2012). Recientemente, se han implementado técnicas más modernas de genómica y metagenómica, las cuales permiten realizar una caracterización más completa, incluyendo la identificación de marcadores moleculares de interés en salud, como los asociados a factores de virulencia o resistencia a antibióticos, incluso en microorganismos no cultivables (Kim et al., 2024; Schmeisser et al., 2007). Dada la importancia de la calidad del agua, es fundamental implementar estas pruebas de detección bacteriana en aguas para el consumo humano y aguas en contacto con las aguas residuales.

El Río Pasto es una afluente del Río Juanambú, ubicado en el departamento de Nariño, Colombia, el cual atraviesa el norte de la ciudad de Pasto (Corporación Autónoma Regional del Nariño, 2019). Este afluente está en contacto con la comunidad y constituye el principal recurso hídrico de la ciudad de Pasto (Jativa, 2009). La cercanía del río con la población hace factible su contaminación por actividades como el descarte de aguas residuales/domésticas, desecho de restos de animales y restaurantes, así como la deforestación de la vegetación cercana al río (Moreno, 2013). Dichos procesos, además, pueden conllevar a posible contaminación por microorganismos, incluyendo miembros de la clase Clostridia que son clínicamente relevantes.

Este estudio buscó identificar las especies Clostridiales presentes en el río Pasto usando una aproximación genómica. El muestreo incluye varios puntos del río, correspondientes a las cuencas alta, media y baja, esta última expuesta a vertimientos de aguas residuales. El análisis bioinformático permitió identificar la presencia de especies Clostridiales, sus factores de virulencia y marcadores de resistencia. Esto último es relevante por la importancia de estas bacterias en la salud pública. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se busca identificar y caracterizar a nivel genómico bacterias clostridiales en cuerpos de agua en la región, siendo un potencial indicador importante de la salud y el estado de este.

2. MÉTODOS

2.1 Recolección de muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas por el Grupo de Investigaciones Microbiológicas del CIMBIUR (GIMUR) en el Río Pasto (Pasto, Nariño) entre septiembre del 2022 y marzo del 2023, en los siguientes puntos (Figura 1): intercambiador vial dolores ($1^{\circ}11'52.1''N$ $77^{\circ}14'19.6''W$; cuenca alta), puente cuartel bomberos sector Aquines ($1^{\circ}12'54.1''N$ $77^{\circ}16'27.2''W$; cuenca media), estación hidrométrica IDEAM sector Pandiaco ($1^{\circ}14'03.9''N$ $77^{\circ}17'34.5''W$; cuenca baja), y colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco ($1^{\circ}13'55.4''N$ $77^{\circ}17'26.8''W$; cuenca baja). Los puntos fueron seleccionados teniendo en consideración el flujo del río (aguas superficiales), así como las zonas de descarga de aguas residuales. En la cuenca baja del río es posible encontrar tanto puntos de descarga de aguas residuales provenientes del alcantarillado de la ciudad, como aguas superficiales, mientras que en la cuenca media y alta únicamente superficiales, muestreando todos

los puntos mencionados. En cada punto se recolectaron 400 mL de agua bien sea en un único momento (simple), o en varios momentos a lo largo del día (compuesta). Las muestras se tomaron en frascos individuales de vidrio y se mantuvieron en frío en neveras portátiles. Posteriormente, cada muestra se filtró al vacío con membranas de nitrocelulosa con poros de diferentes diámetros de manera secuencial (3, 0.45 y 0.22 μm), para concentrar la biomasa. Las membranas se almacenaron en tubos falcon de 50 mL, cubriéndolas con solución salina al 0.9% y almacenándolas a 4°C. Así, se obtuvieron un total de 89 membranas de nitrocelulosa a partir de 28 muestras de agua filtradas, de las cuales 15 correspondieron a la cuenca baja (nueve agua residual y seis aguas superficiales), mientras que las 13 restantes fueron de aguas superficiales siendo seis de la cuenca media y siete de la cuenca alta (Tabla S1).

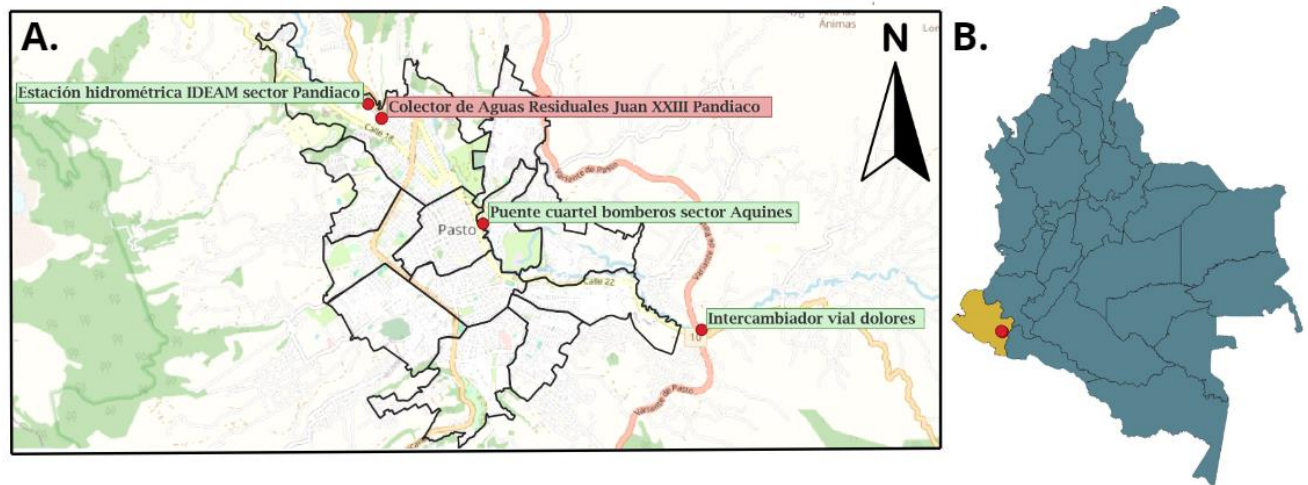


Figura 1. A. Puntos de colecta de las muestras agua. Los puntos en verde representan las aguas superficiales y los rojos las residuales **B.** Ubicación del departamento Nariño en Colombia.

2.2 Cultivo, recuperación de biomasa y extracción de ADN

Las membranas fueron cortadas en cuartos y uno de ellos se cultivó en medio nutritivo para fomentar el crecimiento de las bacterias presentes. Posteriormente, recuperamos la biomasa crecida en el medio y realizamos un sembrado por agotamiento en cromo-agares selectivos para *Clostridioides difficile*. Si bien estos medios se comercializan como selectivos para esta especie, existen reportes de crecimiento de otras especies clostridiales (Muñoz et al., 2019). Luego recuperamos una única Unidad Formadora de Colonia (UFC) por muestra y realizamos su siembra masiva sobre medios nutritivos para aumentar la biomasa. Todas las incubaciones se hicieron a 37°C por 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis. Finalmente, recuperamos biomasa de los

medios, la suspendimos en 400 μ L de caldo BHI (infusión cerebro-corazón) y se incubó a 37°C por 24 horas.

Una primera parte (aproximadamente la mitad) de la biomasa aumentada fue centrifugada y se eliminó el medio de crecimiento. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 500 μ L de caldo nutritivo y glicerol, que fue almacenado a -80°C en para su criopreservación. La segunda parte del Caldo con la biomasa aumentada fue usado para hacer extracción de ADN utilizando el kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Verificamos la integridad del ADN con electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y su concentración y pureza se cuantificó con Nanodrop One. Las muestras con concentración mayor a 30 ng/ μ L y que cumplieron criterios de integridad (n = 26) fueron enviadas a secuenciar en la empresa Novogene.

2.3 Secuenciación y obtención de MAGS

Las 26 muestras arriba mencionadas fueron secuenciadas con Illumina NovaSeq PE150 generando ~1 Gb de datos crudos por muestra. Comprobamos la calidad de las lecturas de cada muestra con FastQC (Andrews, 2010). Los reportes de calidad fueron compilados utilizando MultiQC (Philip et al. 2016). Como criterios de alta calidad de la secuenciación se consideraron: calidad por base de las secuencias > 30, presencia de lecturas sobrerrepresentadas (<1%) y contaminación por adaptadores (<5%).

Debido a la presencia de más de una especie de Clostridiales por muestra, los datos se analizaron con un enfoque metagenómico. Para esto, se obtuvieron MAGS (*Metagenome Assembled Genomes*) a través del procesamiento de las lecturas de alta calidad utilizando MetaSpades con los parámetros por defecto (Nurk et al., 2017). Como parte del análisis, creamos una base de datos de referencia utilizando la función Bowtie-build de Bowtie (Langmead et al., 2009). Posteriormente se realizó el binning (agrupamiento por genomas de acuerdo con las respectivas bases de datos creadas para cada muestra) de las lecturas utilizando tres softwares diferentes: Maxbin (Wu et al., 2015), Metabat (Kang et al., 2019) y Concoct (Alneberg et al., 2014). A continuación, refinamos las agrupaciones (bins) resultantes utilizando DasTools, con configuración por defecto (Sieber

et al., 2018). Revisamos la calidad de los genomas ensamblados con Checkm (Parks et al., 2015), seleccionando los asignados taxonómicamente a la clase Clostridia y que fueran MAGs de alta calidad (completitud $\geq 80\%$ y contaminación $\leq 5\%$) o mediana calidad (completitud $\geq 50\%$ y/o contaminación $\geq 10\%$), aunque el uso de MAGs de mediana calidad se limitó a aquellos con contaminación mínima.

2.4 Caracterización genómica de MAGs y análisis estadístico

Clasificamos taxonómicamente los MAGs obtenidos utilizando GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2019), buscando la asignación de las muestras hasta especie, con valores de asignación ($\text{fastani_ani} > 95\%$ (identidad de nucleótido promedio) y de $\text{fastani_af} > 65\%$ (fracción alineada)). Posteriormente, identificamos factores de virulencia (FV) y marcadores de resistencia a antibióticos (MRA) en los MAGs con Abriicate (Seemann, 2016) usando las bases de datos para factores de virulencia (VFDB) (Liu et al., 2021) y de marcadores de resistencia (CARD) (Alcock et al., 2022). Adicionalmente, realizamos una prueba exacta de Fisher para identificar potenciales asociaciones entre las especies identificadas con tipo de agua, cuenca y mes de recolección. Se estableció una $p < 0.05$ como valor de significancia. Para este paso utilizamos el software STATA14®.

3. RESULTADOS

3.1 Asignación taxonómica, identificación de especies y análisis estadístico

De las muestras de agua colectadas se recuperaron 37 MAGs, 33 de los cuales presentaron alta calidad, mientras que los cuatro restantes fueron de calidad media, pero con una contaminación mínima. Estos MAGs correspondieron a 11 especies de la clase Clostridia, siendo *Clostridium perfringens* la especie más representada (Figura 2). De las especies identificadas se recuperaron al menos dos MAGs, excepto para *C. botulinum*, de la cual se obtuvo solo uno.

	Número de MAGs			Residual	Superficial	Tipo de muestra			Fecha de colecta					
	1	5	10			Baja	Media	Alta	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Febrero	Marzo
<i>Clostridium perfringens</i>	█	█	█	2	8	4	4	2	0	2	3	4	1	0
<i>Clostridium sulfidigenes</i>	█	█	█	2	4	3	0	3	1	0	1	2	2	0
<i>Clostridium tetani</i>	█	█	█	0	5	0	2	3	0	2	0	1	2	0
<i>Pygmaibacter massiliensis</i>	█	█		1	2	1	2	0	0	0	0	1	1	1
<i>Clostridium baratii</i>	█			0	2	0	1	1	0	0	2	0	0	0
<i>Clostridium butyricum</i>	█			0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	0
<i>Clostridioides difficile</i>	█			2	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Lacrimispora celerecrescens</i>	█			0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	1
<i>Paraclostridium sordellii</i>	█			0	2	0	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Terrisporobacter glycolisus</i>	█			0	2	0	2	0	0	0	0	1	0	1
<i>Clostridium botulinum</i>	█			0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Figura 2. Número de MAGs por especie junto con el tipo de muestra del que se obtuvo

Obtuvimos siete MAGs en las muestras de agua residual, y *C. difficile* sólo se detectó en estas aguas (Figura 2; Tabla S2). En contraste, *Clostridium baratii*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium tetani*, *Lacrimispora celerecrescens*, *Paraclostridium sordellii* y *Terrisporobacter glycolisus* fueron exclusivas de aguas superficiales. No observamos asociaciones entre la presencia de estas especies con el tipo de agua, cuenca y fecha de colecta, con dos excepciones: la presencia de *C. difficile* se asoció a aguas residuales ($p = 0.032$) y de *C. sulfidigenes* exclusivamente a aguas superficiales en las cuencas alta y baja ($p = 0.032$).

3.2 Identificación de Factores de Virulencia (FV) y Marcadores de Resistencia (MR)

Cuatro de las 11 especies identificadas mostraron presencia de factores de virulencia (FV): *Clostridium perfringens*, *Clostridium sulfidigenes*, *Clostridioides difficile* y *Terrisporobacter glycolisus*. Quince loci de este tipo diferentes fueron identificados (Figura 3), siendo *C. perfringens* la especie con la mayor variedad y cantidad de FV por MAG, teniendo todos sus MAGs el mismo (o muy similar) perfil (Figura 3). Los dos MAGs de *C. difficile* se diferenciaron el uno del otro, ya que uno tenía los genes *toxA* y *toxB* (codificantes para las principales toxinas de esta especie), pero el otro no tuvo ningún FV. Los FV fueron en su mayoría propios para cada especie, a excepción de *nanH*, que está presente en dos especies diferentes, *C. perfringens* y *T. glycolisus* (Figura 3). En *C. perfringens* se detectaron 12 genes codificantes para toxinas diferentes, cinco de ellos siendo genes *nag*, y el resto siendo la Kappa-toxina (*colA*), toxina alfa (*plc*) y toxina teta (*pfoA*).

Identificamos 19 MRA, que, a diferencia de los FV, se distribuyeron de manera aleatoria intra e inter especies (Figura 4). Solo ocho MAGs no tenían estos marcadores y la mayoría de las especies tuvieron al menos un MR (Figura 4), excepto por *Lacrimispora celerecrescens* y *Clostridium baratii*. Los MAGs de *C. perfringens* mostraron la presencia generalizada del gen *C_perfringens_mprF*, seguido por *tetA(P)* y *tetB(P)* (tetraciclina), los cuales estuvieron en nueve y seis de los MAGs de esta especie, respectivamente (Figura 4). Adicionalmente, *tetA(P)* fue el marcador presente en la mayor cantidad de MAGs, encontrándose en 12, así como el que estuvo en la mayor cantidad de especies diferentes, 4 (Figura 4). Algunos marcadores se presentaron exclusivamente en una única especie, *tetW* (tetraciclina) solamente se observó en *P. massiliensis*, *tetM* (tetraciclina) en *C. difficile* y *ANT(6)-Ia* (aminoglucósidos), *catQ* (fenicol), *cfrC* (lincosamida; macrólido; oxazolidinona; fenicol; estreptogramina), *lnuD* (lincosamidas), *lsaE* (lincosamidas y tetraciclinas) y *mel* (lincosamidas y tetraciclinas) en *C. sulfidigenes* (Figura 4).

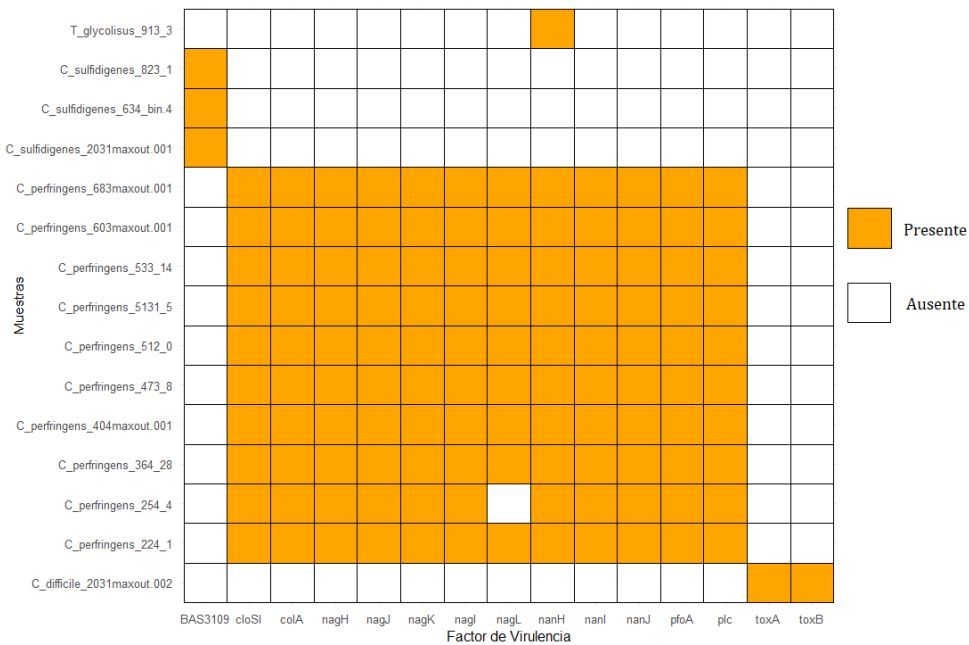


Figura 3. Mapa de calor representando la presencia/ausencia de factores de virulencia en las diferentes especies identificadas (MAGs sin factores de virulencia no se incluyeron).

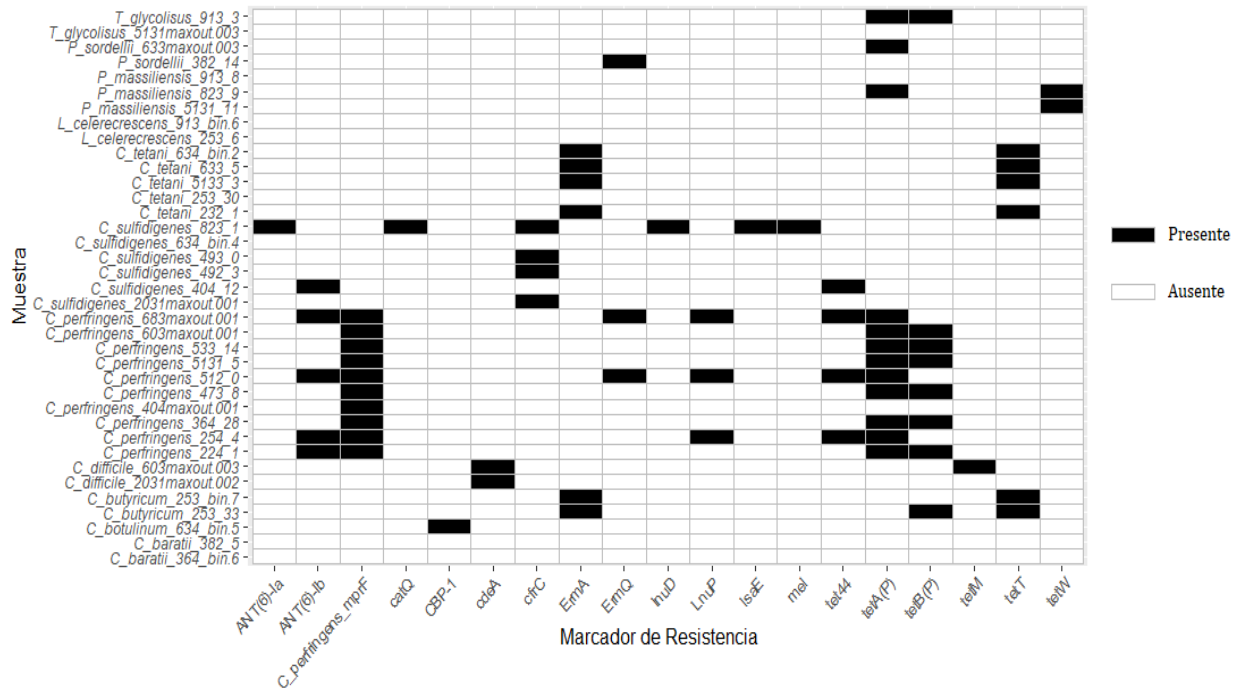


Figura 4. Mapa de calor representando la presencia/ausencia de marcadores de resistencia a antibióticos en las diferentes especies identificadas.

4. DISCUSIÓN

Las actividades humanas pueden ser de alto impacto en la pérdida de la calidad del agua debido a desecho de residuos, contaminación fecal, deforestación y actividad ganadera en estos o en sus proximidades (Su et al., 2024; Dall’Agnol et al., 2022). El vertimiento de aguas residuales en los cuerpos hídricos es una fuente principal de contaminación por microorganismos, siendo la presencia de bacterias clostridiales muy relevante por su importancia clínica y la gran diversidad de infecciones que causan. Debido a la naturaleza anaerobia de los clostridiales, muchas especies no son cultivables y su detección depende de técnicas moleculares, las cuales, a su vez, permiten ensamblar genomas completos (o con un alto grado de completitud) a partir de muestras ambientales (Setubal, 2021).

La detección de clostridiales en aguas de río es un gran mecanismo para evaluar calidad microbiológica del recurso hídrico, y por esto, éste fue el enfoque de este estudio. ; adicional a esto, especies consideradas FIB (bacterias indicadores de contaminación fecal) tienden a tener periodos

de vida cortos (*Escherichia coli* y Enterococos), dificultando este proceso de detección, mientras que los miembros de esta clase cuentan con la facultad de ser generadores de esporas, por lo que pueden permanecer en los cuerpos de agua por una mayor cantidad de tiempo (Mueller-Spitz et al., 2010). La alta abundancia de *C. perfringens* puede ser un indicador de este tipo de contaminación, incluso en puntos anteriores al tramo del río que está en contacto con la ciudad, dado que fueron recuperados en todas las cuencas (alta, media y baja) y antes de que este tuviera contacto con aguas residuales, siendo la única de todas las especies que estuvo presente a lo largo de todo el río; la presencia de *C. difficile* exclusivamente en la cuenca baja puede sugerir que su origen proviene de la ciudad, siendo posible que sea indicador del mismo tipo de contaminación (Kotila et al., 2013; Lin et al., 2015). La presencia de *C. botulinum* exclusivamente en las cuencas altas pueden ser consecuencia de procesos de sedimentación, siendo conocida su distribución en suelos, y llegando a ser reportada en plantas de tratamiento de aguas (Notermans, 1980), su presencia en la cuenca media también puede ser indicador de la descomposición de materia dentro del río, siendo posible la presencia de reservorios (e.j materia en descomposición) en el cuerpo de agua (Espelund & Klaveness, 2014). *C. tetani* está frecuentemente presente en muestras de suelo, pero no se encontraron reportes de contaminación de agua por esta, por lo que es posible que su detección se atribuya, de igual manera, a procesos ocasionales de sedimentación (Shalaby et al., 2023). Adicionalmente, se identificaron dos especies poco conocidas y recientemente descritas, *C. sulfidigenes* y *P. missiliensis*; ambas han sido aisladas y cultivadas, pero se desconoce en su mayoría su rol ecológico y si estas pueden causar infecciones (Sallam & Steinbuchel, 2009; Bilen et al., 2017). *P. missiliensis* fue detectada y descrita a partir de una muestra coprológica de una persona sana, por lo que podría actuar como comensal en el tracto gastrointestinal humano, y, considerando el origen de su única detección, este podría ser indicador de contaminación fecal en el río, haciendo falta más investigación relacionada a esta especie. *C. butyricum*, en contraste con la mayoría de clostridiales, es considerado un probiótico, llegando incluso a ser utilizado para la prevención de infecciones y el mantenimiento de un microbioma intestinal sano (Zhang et al., 2022; Cassir et al., 2016). Teniendo en cuenta las especies identificadas, varias de ellas medicamenten relevantes, la información obtenida en este estudio resulta relevante al dar indicios de la existencia de posibles fuentes de contaminación, que puede ser fecal o por eventos de sedimentación, antes y/o a través de la ciudad abriendo las puertas para la identificación de estas especies, con miras a implementar medidas de control y prevención.

Los factores de virulencia son rasgos que le permiten a un patógeno ser más exitoso a la hora de replicarse, diseminarse y evadir la respuesta inmune de un hospedador, causando enfermedad en el proceso (Cross, 2008; Peterson, 1996). En esta categoría se incluyen toxinas y otras moléculas cuya identificación resulta médicamente relevante. *C. difficile* es una bacteria genómicamente diversa, existiendo cepas no patógenas de esta y siendo la presencia de sus factores de virulencia muy variable, incluso entre clados cercanos; la detección de *toxA* y *toxB* muestra la presencia de linajes de esta especie con potencial patógeno en el río. Estos genes codificantes para las principales toxinas de *C. difficile* están ubicados en el *PaLoc* (locus de patogenicidad), el cual cuenta con una longitud aproximada de 19 Kb y está compuesto de 5 genes (2 toxinas y 3 reguladores) para el caso de las cepas hipervirulentas (Dingle et al., 2013). La ausencia de estos genes en uno de los ensamblajes puede deberse de la circulación de linajes no toxigénicos o a potencial diversidad de este MAG (siendo este de calidad media), a pesar de esto, su identificación confirma la presencia de por lo menos un linaje clínicamente relevante de esta especie en el cuerpo de agua, siendo esta una bacteria que ha sido detectada anteriormente en recursos hídricos y hasta en muestras de agua de llave (Janezic et al., 2016; Kotila et al., 2013; Freier et al., 2023). Los 10 MAGs que fueron asignados a *C. perfringens* contaron con perfiles idénticos, a excepción de *C_perfringens_254_4*, el cual no contó con *nagL*; estos ensamblajes contaron con todos los FV descritos en la cepa 13 de esta especie (Shimizu et al., 2002; Lugli et al., 2017). *C. perfringens* ha sido anteriormente aislada de muestras de agua, he incluso se ha logrado obtener en alimentos bien cocinados (Li et al., 2024), esta especie cuenta con un amplio repertorio de toxinas (>16) las cuales pueden presentarse de muchas combinaciones diferentes (Uzal et al., 2010), en los MAGs obtenidos se observó la presencia de componentes de las toxinas μ y sialidasas, los cuales pueden actuar descomponiendo la capa de mucosa en el intestino humano, además de tener roles en conjunto con otros FV, en algunos casos liberando receptores para permitir la unión de otras toxinas (Adams et al., 2008). Las toxinas alfa han sido detectadas en todas las cepas de la especie y están involucrados en la lisis de las membranas celulares eucariotas (Uzal et al., 2010); en este estudio la Toxina Alfa estuvo presente en todos los MAGs obtenidos. Adicionalmente la toxina theta también fue identificada en esta especie, está hace parte de la familia de toxinas citolisinas dependientes de colesterol y su rol consiste en la creación de poros en las membranas lipídicas de las células del huésped (Johnson & Heuck, 2014). *T. glycolisus* mostró presencia de un único FV, *nanH*, pero en sus MAGs no se identificó ninguno de los FV previamente reportados para esta, aunque previamente se ha

identificado proteínas de adhesión similares a las de otros clostridiales (Böer et al., 2023). Los FV de virulencia (específicamente toxinas) de *C. tetani* están ubicados exclusivamente en plásmidos y ninguno de estos fue detectado en los MAGs de esta especie, por lo que es posible que este material genético quedara excluido del análisis durante el ensamblaje de MAGs o que cepas no patógenas de esta especie circulen el cuerpo de agua, sin embargo, no se encontraron reportes de cepas no patógenas de esta especie (Cohen et al., 2017). La falta de conocimiento e investigación sobre *C. sulfidigenes* impide la comparación de los factores de virulencia observados en esta especie, puesto que no existen estudios previamente publicados. No obstante, se detectó la presencia del gen *BAS3109*, el cual confiere propiedades citolíticas (Chukamnerd et al., 2023), en tres de sus MAGs. Este factor de virulencia es común en *Bacillus anthracis* y ha sido previamente identificado en aislamientos de *C. perfringens*, lo que sugiere que su presencia en esta especie de Clostridiales es plausible (Zeng et al., 2021). Esta información subraya la importancia de monitorear y estudiar los factores de virulencia en los microorganismos presentes en los cuerpos de agua, ya que su identificación tiene implicaciones significativas en los contextos de salud pública y la seguridad alimentaria, puesto que una gran cantidad de las infecciones por estas bacterias se dan por alimentos contaminados por estas (Stelma, 2018).

Los MRA son genes que tienen el potencial de codificar proteínas que pueden hacer que los antibióticos sean inefectivos, aumentando así la tolerancia de la bacteria al medicamento o haciendo que este no tenga ningún efecto en esta (German Center for Infection Research, 2024). Los MRA han surgido rápidamente desde que se empezó a tratar infecciones mediante el uso de antibióticos y han hecho que estas sean de nuevo una amenaza importante (Ventola, 2015). En *C. difficile* es conocida su resistencia a un amplio espectro de antibióticos (ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas, clindamicinas y fluoroquinolonas); esta se beneficia de la vulnerabilidad de otras especies bacterianas a estos, proliferando durante eventos de disbiosis en el microbioma intestinal causados por su uso (Tortajada-Girbés et al., 2021), teniendo en cuenta esto, dos MRA fueron detectados para esta especie: *cdeA*, el cual es una bomba de eflujo que está presente en numerosos linajes de la especie (Dridi et al., 2004; Knight & Riley, 2019) y *tet(M)*, el cual se ha identificado en múltiples especies bacterianas y puede ser obtenido por medio de procesos de transferencia horizontal de genes (siendo posible que este sea el motivo por el cual fue detectado solo en uno de los MAGs), confiriendo estos resistencia a fluoroquinolonas y a tetraciclinas, respectivamente. El

MRA *C_perfringens_mprF* es considerado como uno de los más frecuentes en *C. perfringens*, llegando a ser encontrado en todos los MAGs de la especie; además de este marcador de resistencia a péptidos, también se identificaron los marcadores a tetraciclina *tetA(P)*, *tetB(P)* y *tet44*, siendo este último el menos común de este tipo (~20% de los aislamientos) (Zhong et al., 2023), *LnuP* (lincomicina) y *ErmQ* (el cual permite expresión del fenotipo MLSb, el cual confiere resistencia a múltiples familias de antibióticos) fueron los MRA menos comunes detectados para la especie, siendo encontrado en ~4% de sus genomas públicos (Alcock et al, 2023). Los MAGs de *C. perfringens* mostraron perfiles de resistencia similares a los previamente reportados en la literatura. *C. sulfidigenes* presentó cinco marcadores únicos en uno de sus MAGs, algunos de estos, *catQ* y *cfrC*, han sido previamente reportados en otras especies del género *Clostridium* (Bannam & Rood, 1991; Candela et al., 2017), al no haber estudios previos dedicados a la identificación de MR en esta especie, no es posible la comparación de este perfil con reportes previos, a pesar de esto este MAG resultó ser el ensamblaje de su especie que presentó la resistencia al espectro más amplio de antibióticos. De manera general, los MRA dirigidos a la tetraciclina y a los macrólidos fueron muy comunes en todas las especies identificadas, la alta presencia de estos MRS en el río podría ser indicador de su uso excesivo en la población o en zonas con actividad ganadera, dado que son antibióticos de amplio espectro, comúnmente utilizados como promotores de crecimiento o para la prevención de infecciones en animales, favoreciendo la aparición y persistencia de microorganismos resistentes (Chopra & Roberts, 2001). En resumen, estos hallazgos destacan la importancia de monitorear y controlar el uso de antibióticos para prevenir la propagación de genes de resistencia, que representan una amenaza significativa para la salud pública y los ecosistemas acuáticos.

Este estudio se centró específicamente en la identificación de Clostridiales en el Río Pasto, por lo que la caracterización el futuro de otros grupos microbianos puede ser un buen complemento en el contexto de salud pública. Aunque se rescataron 33 MAGs de alta calidad y se identificaron 11 especies diferentes de Clostridiales, la cantidad de muestras analizadas podría no ser suficiente para capturar toda la diversidad de este grupo bacteriano en el río. Además, la identificación de FV y MR se basó en análisis bioinformáticos, por lo que es necesario continuar con la transcripcional y fenotípica de éstos, que pueda conducir a entender mejor su relevancia clínica y ecológica. Para abordar estas limitaciones, futuros estudios deberían ampliar el número de muestras y su frecuencia

de recolección para obtener una visión más detallada de la diversidad de Clostridiales en el río. Además, es crucial investigar las posibles fuentes de contaminación para desarrollar estrategias efectivas de mitigación. Establecer un programa de monitoreo continuo permitirá evaluar la efectividad de las medidas implementadas y detectar oportunamente cualquier cambio en la presencia de microorganismos patógenos en el río. Estos pasos contribuirán a una mejor gestión del riesgo microbiológico en el Río Pasto y demás cuerpos de agua a nivel nacional.

5. CONCLUSIONES

Este estudio permitió la identificación de 11 especies de Clostridiales en el Río Pasto, así como la caracterización de FVA y MRA presentes en estas especies. Además, se obtuvieron MAGs de alta calidad de las especies recientemente descritas *C. sulfidigenes* y *P. massiliensis*, de las cuales se desconoce su rol ecológico o potencial como patógenos. A pesar de esto, se identificaron FV y MAR en estos MAGs, sugiriendo su posible relevancia clínica y resaltando la necesidad de más investigación sobre estas especies. Los resultados muestran la presencia de bacterias clostridiales de importancia clínica en el cuerpo de agua, varias de las cuales presentan múltiples MRA, lo que tiene implicaciones significativas para el tratamiento de infecciones. La presencia de *C. perfringens* en el río, reflejada en los 10 MAGs recuperados, indica una posible contaminación fecal, lo que subraya la importancia de identificar las fuentes de esta contaminación. La alta presencia de MRA en estas bacterias puede llevar a complicaciones en el tratamiento de infecciones, por lo que es crucial implementar medidas de vigilancia y monitoreo de las especies presentes en el río. Además, es necesario realizar más investigaciones dirigidas a la detección y caracterización de microorganismos patógenos en este cuerpo de agua y a sus posibles fuentes de contaminación, dada la limitada literatura disponible sobre el tema en esta región y en el resto del país.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis, Marina Muñoz y a las investigadoras de la línea de bacterias del CIMBIUR, especialmente a Laura Vega, Laura Bohórquez, Vanessa Urrea y Anny Camargo, quienes me ayudaron, instruyeron y guiaron en este proceso. También agradezco a mis amigos: Camilo Peralta, Camilo Márquez, Yessica Hoyos y Julián Vargas, quienes me apoyaron en todo momento, así como mis padres y mi hermano. Finalmente, agradezco al CIMBIUR, a la Universidad del Rosario y al Fondo Colombiano por la Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías por la financiación de este proyecto.

7. REFERENCIAS

- Adams, J. J., Gregg, K., Bayer, E. A., Boraston, A. B., & Smith, S. P. (2008). Structural basis of *Clostridium perfringens* toxin complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12194–12199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803154105>
- Akhi, M. T., Asl, S. B., Pirzadeh, T., Naghili, B., Yeganeh, F., Memar, Y., & Mohammadzadeh, Y. (2015). Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(7). <https://doi.org/10.5812/jjm.20863v2>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., . . . McArthur, A. G. (2022). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690-D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., De Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., Lahti, L., Loman, N. J., Andersson, A. F., & Quince, C. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods*, 11(11), 1144-1146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>

- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bien, J., Palagani, V., & Bozko, P. (2012). The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 53–68. <https://doi.org/10.1177/1756283x12454590>
- Bilen, M., Mbogning, M., Cadoret, F., Dubourg, G., Daoud, Z., Fournier, P., & Raoult, D. (2017). ‘*Pygmaibacter massiliensis*’ sp. nov., a new bacterium isolated from the human gut of a Pygmy woman. *New Microbes and New Infections*, 16, 37–38. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.12.015>
- Böer, T., Bengelsdorf, F. R., Bömeke, M., Daniel, R., & Poehlein, A. (2023). Genome-based metabolic and phylogenomic analysis of three *Terrisporobacter* species. *PloS One*, 18(10), e0290128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290128>
- Botes, M., De Kwaadsteniet, M., & Cloete, T. E. (2012). Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical And Bioanalytical Chemistry/Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 405(1), 91-108. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6399-3>
- Cassir, N., Benamar, S., & La Scola, B. B. (2016). *Clostridium butyricum* : from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.014>
- Cersosimo LM, Worley JN, Bry L. Approaching pathogenic Clostridia from a One Health perspective. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Jan 9:2024.01.08.574718. doi: 10.1101/2024.01.08.574718. Update in: *Anaerobe*. 2024 Jun;87:102839. doi: 10.1016/j.anaerobe.2024.102839. PMID: 38260382; PMCID: PMC10802438.

- Chaumeil, P., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H. (2019). GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics*, 36(6), 1925-1927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Chapeton-Montes, D., Plourde, L., Bouchier, C., Ma, L., Diancourt, L., Criscuolo, A., Popoff, M. R., & Brüggemann, H. (2019). The population structure of *Clostridium tetani* deduced from its pan-genome. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47551-4>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and Epidemiology of Bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/membr.65.2.232-260.2001>
- Chukamnerd, A., Jeenkeawpiam, K., Chusri, S., Pomwised, R., Singkhamanan, K., & Surachat, K. (2023). BACSEQ: a User-Friendly automated pipeline for Whole-Genome sequence analysis of bacterial genomes. *Microorganisms*, 11(7), 1769. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071769>
- Cohen, J. E., Wang, R., Shen, R., Wu, W. W., & Keller, J. E. (2017). Comparative pathogenomics of *Clostridium tetani*. *PloS One*, 12(8), e0182909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182909>
- Corporación Autónoma Regional del Nariño. (2019). Elaboración del plan de ordenación y manejo de la cuenca hidrográfica del río Juanambú. <http://repositorio.gestiondelriesgo.gov.co/handle/20.500.11762/32553>
- Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor? *Critical Care*, 12(6), 197. <https://doi.org/10.1186/cc7127>
- Dall’Agnol, R., Sahoo, P. K., Salomão, G. N., De Araújo, A. D. M., Da Silva, M. S., Powell, M. A., Ferreira, J., Junior, Ramos, S. J., Martins, G. C., Da Costa, M. F., & Guilherme, L. R. G. (2022). Soil-sediment linkage and trace element contamination in forested/deforested

areas of the Itacaiúnas River Watershed, Brazil: To what extent land-use change plays a role? *Science of the Total Environment*, 828, 154327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154327>

Dingle, K. E., Elliott, B., Robinson, E., Griffiths, D., Eyre, D. W., Stoesser, N., Vaughan, A., Golubchik, T., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., Peto, T. E., Walker, A. S., Riley, T. V., Crook, D. W., & Didelot, X. (2013). Evolutionary History of the *Clostridium difficile* Pathogenicity Locus. *Genome Biology and Evolution*, 6(1), 36–52. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt204>

Dridi, L., Tankovic, J., & Petit, J. (2004). CdeA of *Clostridium difficile*, a New Multidrug Efflux Transporter of the MATE Family. *Microbial Drug Resistance*, 10(3), 191–196. <https://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.191>

Du P, Cao B, Wang J, Li W, Jia H, Zhang W, Lu J, Li Z, Yu H, Chen C, Cheng Y. Sequence variation in *tcdA* and *tcdB* of *Clostridium difficile*: ST37 with truncated *tcdA* is a potential epidemic strain in China. *J Clin Microbiol*. 2014 Sep;52(9):3264-70. doi: 10.1128/JCM.03487-13. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24958798; PMCID: PMC4313148.

Espelund, M., & Klaveness, D. (2014). Botulism outbreaks in natural environments – an update. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00287>

Freier, L., Zacharias, N., Gemein, S., Gebel, J., Engelhart, S., Exner, M., & Mutters, N. T. (2023). Environmental Contamination and Persistence of *Clostridioides difficile* in Hospital Wastewater Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(5). <https://doi.org/10.1128/aem.00014-23>

German Center for Infection Research (2024). Resistance gene <https://www.dzif.de/en/glossary/resistance-gene>.

- Gupta, A., Gupta, R., & Singh, R. L. (2016). Microbes and Environment. En Springer eBooks (pp. 43-84). https://doi.org/10.1007/978-981-10-1866-4_3
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2018). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309-D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Jaime Huerta-Cepas, Damian Szklarczyk, Davide Heller, Ana Hernández-Plaza, Sofia K Forslund, Helen Cook, Daniel R Mende, Ivica Letunic, Thomas Rattei, Lars J Jensen, Christian von Mering, Peer Bork *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8; 47(Database issue): D309–D314. doi: 10.1093/nar/gky1085
- Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., & Rupnik, M. (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *PLoS One*, 11(11), e0167101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>
- Játiva, C. L. (2009). El Río Pasto como elemento conector de la ciudad (Parque Central Pasto). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/4001>.
- Johnson, B. B., & Heuck, A. P. (2014). Perfringolysin O Structure and mechanism of pore formation as a paradigm for Cholesterol-Dependent cytolysins. In *Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry* (pp. 63–81). https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6_5
- Kang, D., Li, F., Kirton, E. S., Thomas, A., Egan, R. S., An, H., & Wang, Z. (2019). MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ*, 7, e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>

- Kator, H., & Rhodes, M. (2003). Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance. En Elsevier eBooks (pp. 113-144). <https://doi.org/10.1016/b978-012470100-7/50009-1>
- Kellenberger, E. (2001). Exploring the unknown. *EMBO Reports*, 2(1), 5-7. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve014>
- Kim, N., Ma, J., Kim, W., Kim, J., Belenky, P., & Lee, I. (2024). Genome-resolved metagenomics: a game changer for microbiome medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(7), 1501–1512. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01262-7>
- Knight, D. R., & Riley, T. V. (2019). Genomic Delineation of Zoonotic Origins of *Clostridium difficile*. *Frontiers in Public Health*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00164>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25 (2009). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
- León, D. F. (2023). Diagnóstico sobre la gestión en torno a la calidad del agua en el río Pasto. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/64260>.
- Li, M., Wang, Y., Hou, B., Chen, Y., Hu, M., Zhao, X., Zhang, Q., Li, L., Luo, Y., Liu, Y., & Cai, Y. (2024). Toxin gene detection and antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* from aquatic sources. *International Journal of Food Microbiology*, 110642. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110642>
- Lin, C., Wade, T., & Hilborn, E. (2015). Flooding and *Clostridium difficile* Infection: A Case-Crossover Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health/International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(6), 6948–6964. <https://doi.org/10.3390/ijerph120606948>

- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2021). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D912-D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- Lugli, G. A., Milani, C., Mancabelli, L., Turrone, F., Ferrario, C., Duranti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: a genomic tale from the Copper Age. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0221-y>
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S. M., Thompson, D. L., Wilson, L. E., & Fridkin, S. K. (2014). Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *New England Journal of Medicine* / the *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1306801>
- Mazzoli, R., Pescarolo, S., Gilli, G., Gilardi, G., & Valetti, F. (2024). Hydrogen production pathways in Clostridia and their improvement by metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 73, 108379. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108379>
- Moreno LF. Gestión Integral del Agua en la Cuenca Alta del Río Pasto (2013). Mediante un Esquema de Pago por Servicios Ambientales. Universidad de Nariño [Internet].. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/147429716.pdf>
- Mueller-Spitz, S. R., Stewart, L. B., Klump, J. V., & McLellan, S. L. (2010). Freshwater Suspended Sediments and Sewage Are Reservoirs for Enterotoxin-Positive Clostridium perfringens. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5556–5562. <https://doi.org/10.1128/aem.01702-09>
- Muñoz, M., Restrepo-Montoya, D., Kumar, N., Iraola, G., Herrera, G., Ríos-Chaparro, D. I., Díaz-Arévalo, D., Patarroyo, M. A., Lawley, T. D., & Ramírez, J. D. (2019). Comparative genomics identifies potential virulence factors in Clostridium tertium and C. paraputrificum. *Virulence*, 10(1), 657–676. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1637699>

- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* (2017) May;27(5):824-834. doi: 10.1101/gr.213959.116. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28298430; PMCID: PMC5411777.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Peterson, J. W. (1996). Bacterial pathogenesis. *Medical Microbiology* - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
- Philip Ewels, Måns Magnusson, Sverker Lundin, Max Käller, MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report, *Bioinformatics*, Volume 32, Issue 19, October 2016, Pages 3047–3048, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 68(4), 686-691. <https://doi.org/10.1128/membr.68.4.686-691.2004>
- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 955–962. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seemann, T. (2016). ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. <https://github.com/tseemann/abricate>

Setlow, P. (2014). Spore resistance properties. *Microbiology Spectrum*, 2(5).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0003-2012>

Setubal, J. C. (2021). Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges. *Biophysical Reviews*, 13(6), 905–909. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00865-y>

Shalaby, M., Catenazzi, A., Smith, M., Farrow, R., & Farcy, D. (2023). 157 an assessment of the prevalence of clostridium tetani in the environment. *Annals of Emergency Medicine*, 82(4), S68. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2023.08.179>

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., & Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 996–1001. <https://doi.org/10.1073/pnas.022493799>

Sieber, C. M. K., Probst, A. J., Sharrar, A., Thomas, B. C., Hess, M., Tringe, S. G., & Banfield, J. F. (2018). Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy. *Nature Microbiology*, 3(7), 836-843. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1>

Sloan, J., McMurry, L. M., Lyras, D., Levy, S. B., & Rood, J. I. (1994). The *Clostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: tetA(P), which mediates active tetracycline efflux, and tetB(P), which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. *Molecular Microbiology*, 11(2), 403–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00320.x>

Stelma, G. N. (2018). Use of bacterial spores in monitoring water quality and treatment. *Journal of Water and Health*, 16(4), 491–500. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.013>

Su, Y., Gao, R., Huang, F., Liang, B., Guo, J., Fan, L., Wang, A., & Gao, S. (2024). Occurrence, transmission and risks assessment of pathogens in aquatic environments accessible to

humans. *Journal of Environmental Management*, 354, 120331.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120331>

Suchodolski, J. S. (2013). Gastrointestinal microbiota. In *Elsevier eBooks* (pp. 32–41).
<https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-3661-6.00002-x>

Syuhadah, A. S. N., Ali, U., & Norazizah, M. (2020). A rare and fatal case of *Terrisporobacter glycolicus* bacteremia: Case report and review of literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 101, 151. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.410>

Tortajada-Girbés, M. et al. (2021) 'Alimentary and Pharmaceutical Approach to Natural Antimicrobials against *Clostridioides difficile* Gastrointestinal Infection,' *Foods*, 10(5), p. 1124. <https://doi.org/10.3390/foods10051124>.

Uzal, F. A., Vidal, J. E., McClane, B. A., & Gurjar, A. A. (2010). *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. PubMed Central (PMC).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917546/>

Ventola, C.L. (2015) The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and threats.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>.

Wells CL, Wilkins TD. Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 18. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8219/>

Wu, Y., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2015). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 32(4), 605-607.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>

Zeng, X., Liu, B., Zhou, J., Dai, Y., Han, C., Wang, L., Wu, Y., & Zhang, J. (2021). Complete genomic sequence and analysis of β 2 toxin gene mapping of *Clostridium perfringens*

JXJA17 isolated from piglets in China. *Scientific Reports*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-79333-8>

Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>

Zhang, X., Song, M., Lv, P., Hao, G., & Sun, S. (2022). Effects of *Clostridium butyricum* on intestinal environment and gut microbiome under *Salmonella* infection. *Poultry Science*, 101(11), 102077. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102077>

Zhang, Y., Xiao, L., Wang, S., & Liu, F. (2019). Stimulation of ferrihydrite nanorods on fermentative hydrogen production by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, 283, 308-315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.088>

Zhong, J. X., Zheng, H. R., Wang, Y. Y., Bai, L. L., Du, X. L., Wu, Y., & Lu, J. X. (2023). Molecular characteristics and phylogenetic analysis of *Clostridium perfringens* from different regions in China, from 2013 to 2021. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1195083>

Información Suplementaria

Tabla S1. Información de las membranas, incluyendo coordenadas, tipo de agua, tipo de muestreo y fecha de recolección.

ID Pasto	Tamaño Poro (µm)	ID membrana	Tipo de agua	Tipo de muestra	Locación	Coordenadas	Fecha
18	3.0	18.3	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	21/09/2022
	0.45	18.45	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	21/09/2022
	0.22	18.22	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	21/09/2022
20	3.0	20.3	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/09/2022
	0.45	20.45	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/09/2022
	0.22	20.22	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/09/2022
22	3.0	22.3	Superficial	Simple	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	18/10/2022
	0.45	22.45	Superficial	Simple	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	18/10/2022
	0.22	22.22	Superficial	Simple	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	18/10/2022
23	3.0						18/10/2022
		23.3	Superficial	Compuesta	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	
	0.45	22.45	Superficial	Compuesta	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	18/10/2022
	0.22	23.22	Superficial	Compuesta	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	18/10/2022
25	0.22	23.22-2	Superficial	Compuesta	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	18/10/2022
	3.0	25,3	Superficial	Compuesta	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	18/10/2022
	0.45	25,45	Superficial	Compuesta	Punto2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	18/10/2022
	0.22	25,22	Superficial	Compuesta	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	18/10/2022
27	0.22	25,22-2	Superficial	Compuesta	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	18/10/2022
	3.0	27,3	Superficial	Compuesta	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	18/10/2022
	0.45	27,45	Superficial	Compuesta	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	18/10/2022
	0.22	27,22	Superficial	Compuesta	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	18/10/2022
29	3.0	29,3	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	19/10/2022
	0.45	29,45	Residual	Simple	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	19/10/2022
34	3.0	34,3	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	19/10/2022
	0.45	34,45	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	19/10/2022

	0.22	34,22	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	19/10/2022
	0.22	34,22-2	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	19/10/2022
36	3.0	36,3	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	22/11/2022
	0.45	36,45	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	22/11/2022
	0.22	36,22	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	22/11/2022
	0.22	36,22-2	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	22/11/2022
38	3.0	38,3	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	22/11/2022
	0.45	38,45	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	22/11/2022
	0.22	38,22	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	22/11/2022
	0.22	38,22-2	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	22/11/2022
40	3.0	40,3	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	22/11/2022
	0.45	40,45	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	22/11/2022
	0.22	40,22	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	22/11/2022
	0.22	40,22-2	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	22/11/2022
47	3.0	47,3	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/11/2022
	0.45	47,45	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/11/2022
	0.22	47,22	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/11/2022
	0.22	47,22-2	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	23/11/2022
49	3.0	49,3	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	13/12/2022
	0.45	49,45	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	13/12/2022
	0.22	49,22	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	13/12/2022
	0.22	49,22-2	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	13/12/2022
51	3.0	51,3	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	13/12/2022
	0.45	51,45	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	13/12/2022
	0.22	51,22	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	13/12/2022
	0.22	51,22-2	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	13/12/2022
53	3.0	53,3	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	13/12/2022
	0.45	53,45	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	13/12/2022
	0.22	53,22	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	13/12/2022
	0.22	53,22-2	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	13/12/2022

60	3.0	60,3	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	14/12/2022
	0.45	60,45	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	14/12/2022
	0.22	60,22	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	14/12/2022
	0.22	60,22-2	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	14/12/2022
63	3.0	63,3	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/02/2023
	0.45	63,45	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/02/2023
68	3.0	68,3	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/02/2023
	0.45	68,45	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/02/2023
73	3.0	73,3	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/02/2023
	0.45	73,45	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/02/2023
82	3.0	82,3	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	22/02/2023
	0.45	82,45	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	22/02/2023
85	3.0	85,3	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/03/2023
	0.45	85,45	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/03/2023
	0.22	85,22	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/03/2023
86	3.0	86,3	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/03/2023
	0.45	86,45	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/03/2023
	0.22	86,22	Superficial	Compuesto	Punto 1	1°11'52.1"N 77°14'19.6"W - Intercambiador vial dolores	21/03/2023
90	3.0	90,3	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/03/2023
	0.45	90,45	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/03/2023
	0.22	90,22	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/03/2023
91	3.0	91,3	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/03/2023
	0.45	91,45	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/03/2023
	0.22	91,22	Superficial	Compuesto	Punto 2	1°12'54.1"N 77°16'27.2"W - Puente cuartel bomberos sector Aquines	21/03/2023
95	3.0	95,3	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/03/2023
	0.45	95,45	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/03/2023
	0.22	95,22	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/03/2023
96	3.0	96,3	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/03/2023
	0.45	96,45	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/03/2023

	0.22	96,22	Superficial	Compuesto	Punto 3	1°14'03.9"N 77°17'34.5"W - Estación hidrométrica IDEAM secto Pandiaco	21/03/2023
104	3.0	104,3	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	22/03/2023
	0.45	104,45	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	22/03/2023
	0.22	104,22	Residual	Compuesto	Colector	1°13'55.4"N 77°17'26.8"W - Colector de aguas residuales Juan XXIII Pandiaco	22/03/2023

Tabla S2. Valores de calidad y contaminación de los MAGs, junto con la cuenca y tipo de agua de la que fueron recuperados.

Nombre MAG	Completo	Contaminación	Tipo muestra		Cuenca		
			Residual	Superficial	Baja	Media	Alta
C_difficile_2031maxout.002	99,45	0,88					
C_difficile_603maxout.003	81,94	3,21					
C_baratii_364_bin.6	98,39	2,42					
C_baratii_382_5	99,19	1,61					
C_botulinum_634_bin.5	96,07	0,73					
C_butyricum_253_33	99,19	0,81					
C_butyricum_253_bin.7	80,65	0,81					
C_perfringens_224_1	100	7,7					
C_perfringens_5131_5	100	0,09					
C_perfringens_254_4	100	0					
C_perfringens_533_14	100	0,09					
C_perfringens_364_28	100	0					
C_perfringens_603maxout.001	100	0,09					
C_perfringens_404maxout.001	97,58	0,09					
C_perfringens_683maxout.001	100	0,81					
C_perfringens_473_8	100	0,09					
C_perfringens_512_0	100	0,81					
C_sulfidigenes_2031maxout.001	98,46	1,78					

C_sulfidigenes_404_12	97,77	2,47					
C_sulfidigenes_492_3	97,77	2,47					
C_sulfidigenes_493_0	97,77	2,47					
C_sulfidigenes_634_bin.4	98,46	3,16					
C_sulfidigenes_823_1	96,39	2,82					
C_tetani_232_1	97,93	0,82					
C_tetani_5133_3	80,19	0,83					
C_tetani_634_bin.2	95,17	0,82					
C_tetani_253_30	99,19	0,81					
C_tetani_633_5	97,89	0,96					
L_celerecrescens_253_6	52,31	1,6					
L_celerecrescens_913_bin.6	96,68	0					
P_sordellii_382_14	100	1,4					
P_sordellii_633maxout.003	90,85	18,08					
P_massiliensis_823_9	97,99	0					
P_massiliensis_5131_11	97,99	0					
P_massiliensis_913_8	97,99	0					
T_glycolisus_5131maxout.003	97,18	0					
T_glycolisus_913_3	98,59	2,82					