

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

**Análisis de genomas obtenidos a partir de metagenomas dentro del filo
Chloroflexi provenientes de tapetes microbianos de fuentes termales de Costa
Rica utilizando herramientas bioinformáticas**

**“Modalidad del trabajo de graduación” presentado como requisito parcial
para optar al grado de Licenciatura en Biología con énfasis en
Biotecnología**

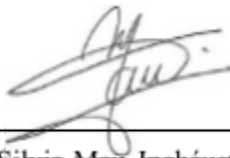
Estudiante: Kimberly Agüero Rojas

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2022**

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



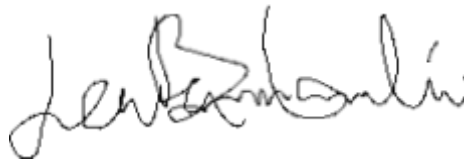
Dr. Frank Solano Campos
Representante, Decano, quién preside



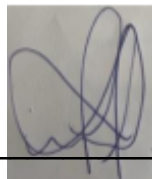
Dra. Silvia Mau Incháustegui
Representante Unidad Académica



M.Sc Lorena Uribe Lorío
Tutora



M.Sc Laura Brenes Guillén
Asesora



Dra. Stefany Solano González
Asesora



M.Sc. Mónica Rojas Gómez
Invitada especial

Agradecimientos

A Dios, mi familia, al CIBCM que me abrió las puertas, a mi tutora Lorena, a mis asesoras Laura y Stefany, a mis profesores y compañeros de la UNA. A todos gracias por ser parte del proceso y contribuir a mi crecimiento y formación profesional.

Dedicatoria

A mi papá y a mi mamá por su trabajo y sacrificio durante todos estos años. A mi hermano y a Gabriel que siempre estuvieron ahí. ¡Gracias infinitas!

Índice

Miembros del Tribunal I

AgradecimientosIII

DedicatoriaIV

ÍndiceV

Índice de cuadrosVI

Índice de figurasVII

AbreviaturasVIII

ResumenIX

1. Introducción1

1.1 Antecedentes2

1.2 Justificación4

1.3 Problema5

1.4 Objetivos6

1.4.1 Objetivo General6

1.4.2 Objetivos Específicos6

2. Marco Teórico6

3. Marco Metodológico18

4. Resultados20

5. Discusión43

6. Conclusiones51

7. Recomendaciones52

8. Referencias bibliográficas52

9. Anexos77

Índice de cuadros

Cuadro 1. Temperatura y pH de las 14 fuentes termales de Costa Rica.....	18
Cuadro 2. Lista de genes termotolerantes reportados en <i>Escherichia coli</i> tomados del artículo “Actualización de genes termotolerantes esenciales para la supervivencia a altas temperaturas”.....	21
Cuadro 3. Descripción de completitud, contaminación, clasificación taxonómica y similitud de las secuencias del gen 16S ARNr de 70 MAGs dentro del filo Chloroflexi en 14 fuentes termales de Costa Rica.....	30
Cuadro 4. Comparación de rangos de temperatura en las clases del filo Chloroflexi, entre lo reportado y lo estudiado.....	34
Cuadro 5. Presencia de los genes <i>hrcA</i> , <i>grpE</i> , <i>dnaK</i> y <i>dnaJ</i> en los 70 MAGs y los 6 genomas de referencia correspondientes a cada clase del filo Chloroflexi.....	35
Cuadro 6. Presencia de los genes <i>atpA</i> , <i>atpD</i> y <i>atpG</i> en los 70 MAGs y los 6 genomas de referencia correspondientes a cada clase del filo Chloroflexi.....	37
Cuadro 7. Presencia de los genes <i>ruvA</i> , <i>ruvB</i> y <i>ruvC</i> en los 70 MAGs y los 6 genomas de referencia correspondientes a cada clase del filo Chloroflexi.....	40

Índice de figuras

Figura 1. Estratificación intraespecífica. Un menor porcentaje de ANI (95% ANI) y un mayor número de variantes de un solo nucleótido (SNV), representa una mayor posibilidad de subdivisión en curso de una especie. Modificado de (Van Rossum <i>et al.</i> , 2020)	15
Figura 2. Cantidad de MAGS dentro de las clases del filo Chloroflexi en 14 fuentes termales de Costa Rica.	28
Figura 3. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr relacionadas con el filo Chloroflexi en un conjunto de datos de 27 MAGs de fuentes termales de Costa Rica.	32
Figura 4. Filogenia de los MAGs dentro del filo Chloroflexi. Árbol filogenómico construido a partir de 24 genomas de referencia completos y los 74 MAGs en estudio.	33
Figura 5. Representación parcial del gen <i>dnaK</i> con los genes seleccionados. El color verde hace referencia al dominio C terminal, el azul al dominio catalítico y el amarillo al dominio N terminal.	37
Figura 6. Representación parcial del gen <i>atp</i> con los genes seleccionados. El color verde hace referencia al dominio C terminal, el azul al dominio catalítico y el amarillo al dominio N terminal.	40
Figura 7. Representación del gen <i>atp</i> con los genes seleccionados. El color verde hace referencia al dominio C terminal, el azul al dominio catalítico y el amarillo al dominio N terminal.	42

Abreviaturas o acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ANI (siglas en inglés)	Identidad promedio de nucleótidos.
ARDRA (siglas en inglés)	Análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia.
ATP	Adenosín trifosfato.
CIBCM	Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular.
HSP (siglas en inglés)	Proteínas de choque térmico.
MAG (siglas en inglés)	Genoma obtenido a partir de metagenoma.
MSA (siglas en inglés)	Alineamiento de secuencia múltiple.
NCBI (siglas en inglés)	Centro Nacional de Información Biotecnológica.
PCR (siglas en inglés)	Reacción en cadena de la polimerasa.
PNY	Parque Nacional Yellowstone.
OTU (siglas en inglés)	Unidad Taxonómica Operativa.
SMRT (siglas en inglés)	Secuenciación en tiempo real de una sola molécula.
SNV (siglas en inglés)	Variante de un solo nucleótido.

Resumen

El filo Chloroflexi está conformado por bacterias filamentosas fotoheterótrofas que se caracterizan por tener amplia diversidad metabólica y ecológica. Se pueden encontrar en distintos ambientes. Hasta el momento, no existe información acerca de su diversidad y distribución en fuentes termales de Costa Rica. El objetivo de este trabajo fue determinar la similitud y relaciones filogenéticas entre los MAGs (genomas obtenidos a partir de datos metagenómicos) de estos ambientes y genomas de referencia, además de la identificación de posibles genes relacionados con la termotolerancia. Los sitios de estudio correspondieron a 14 tapetes microbianos de fuentes termales con rangos de temperatura entre 35 °C y 75 °C. Los MAGs fueron generados mediante el *binning* de metagenomas. Se realizó el análisis de similitud de secuencias utilizando ANI, el análisis de calidad mediante CheckM y el programa GTDB-Tk, para obtener la clasificación taxonómica. Para la anotación y construcción del árbol filogenómico se utilizó Prokka v1.14.5 y Orthofinder v2.3.3. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó MEGA X y Mr.Bayes. Para la búsqueda de genes relacionados con la termotolerancia se utilizó como referencia el artículo de Murata y colaboradores (2018). Se construyó una base de 143 genomas afiliados a Chloroflexi utilizando como referencia GenBank y Ensembl-Bacteria (EMBL-EBI). Se ensamblaron 74 MAGs clasificados en las clases Anaerolineae (40), Chloroflexia (10), Thermoflexia (9), Tepidiformia (7), Caldilineae (5) y

Ktedonobacteria (1). Con respecto a la temperatura, Ktedonobacteria se encontró a 50 °C en la fuente termal Hornillas, Dehalococcoidea y Anaerolineae se encontraron en un rango de temperatura 35 °C a 60 °C. Chloroflexi y Caldilinea principalmente a 60 °C. Thermoflexia, específicamente *Thermoflexus hugenholtzii* JAD2, se encontró en la fuente termal Las Lilas (75 °C, conductividad > 13 000 uS). Se identificaron 10 genes los cuales forman parte del sistema de chaperonas, los cuales participan en el metabolismo energético y en la reparación del ADN. En este estudio, se identificaron seis clases del filo Chloroflexi, contribuyendo al conocimiento de este filo a nivel de diversidad y distribución en los tapetes microbianos de fuentes termales de Costa Rica. A partir de los resultados obtenidos, se sugiere una nueva diversidad del filo en estos ambientes, ya que el análisis filogenómico resulta en la presencia de clados distintos a los reportados en la literatura.

1. Introducción

Las fuentes termales son ecosistemas que están vinculados a la actividad volcánica o a fallas tectónicas. Entre sus características fisicoquímicas, se encuentran las temperaturas elevadas, generalmente mayores a 35 °C, y un pH que puede variar desde aguas muy ácidas (pH 0.2) a muy básicas (pH 11), dependiendo mayormente de la presencia de sulfatos, silicatos y carbonatos (Dodds y Whiles, 2010). Dada las condiciones físicas, químicas y ambientales, las fuentes termales son sitios únicos para el desarrollo de microorganismos extremófilos (Wemheuer *et al.*, 2013) usualmente mediante la formación de tapetes microbianos (Mahajan, y Balachandran, 2017). Los microorganismos extremófilos son aquellos capaces de vivir en condiciones extremas, por ejemplo, altas y bajas temperaturas, alto y bajo pH (Oliart-Ros, Manresa-Presas y Sánchez-Otero, 2016). En dichos tapetes microbianos, se han identificado nuevas especies de bacterias como algunas de los géneros *Synechococcus*, *Chloroflexi* y *Roseiflexus* (Saiki, Kimura, y Arima, 1972; Bauld y Brock, 1973; Hanada, 2003; Lau, Aitchison y Pointing, 2008).

Para estudiar estos microorganismos y sus componentes, inicialmente se utilizaron técnicas dependientes de cultivo, tales como la secuenciación directa de fragmentos cortos de ADN mediante el método de Sanger, conocida como la secuenciación de primera generación (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977). Unas décadas después surge la secuenciación masiva; esta se diferencia a la secuenciación Sanger, en que permite realizar análisis masivos en paralelo y obtener un mayor rendimiento a partir de múltiples muestras a un costo mucho menor (Kulski, 2016). Gracias a la secuenciación masiva y a los avances bioinformáticos, se han podido obtener y analizar genomas de los organismos que se encuentran en una comunidad y los cuales, en la mayoría de los casos no han sido cultivados (Ghurye, Cepeda y Pop, 2016). A partir de datos metagenómicos es posible la recuperación de genomas obtenidos a partir de metagenomas (MAGs, por sus siglas en inglés). Estos se obtienen mediante la agrupación de contigs que poseen composición de secuencias, profundidad de cobertura y afiliaciones taxonómicas similares (Parks *et al.*, 2017). Entre sus múltiples aplicaciones, se ha logrado determinar la diversidad funcional de comunidades microbianas, se han realizado análisis comparativos y

determinación de relaciones filogenéticas (López *et al.*, 2015). Este estudio pretende realizar una comparación filogenómica de los MAGs asociados al filo Chloroflexi, así como la búsqueda de genes relacionados con la termotolerancia de estos microorganismos.

1.1 Antecedentes

Las fuentes termales han sido estudiadas desde el siglo XIX, enfocándose en las propiedades físicoquímicas y geológicas; sin embargo, a mediados del siglo XX se inició con los estudios microbiológicos de estos ecosistemas alrededor del mundo (López, Cerdán y González, 2013). Estos estudios microbiológicos inicialmente se basaban en observaciones al microscopio, por lo que no fue hasta el siglo XIX que se desarrollaron las técnicas de cultivo puro, en las que los microorganismos se estudiaron y caracterizaron (Pace, 1997). Un ejemplo de esto fue el aislamiento de *Thermus aquaticus*, proveniente de las fuentes termales del Parque Nacional Yellowstone (PNY) en Estados Unidos, microorganismo importante en la biotecnología ya que, a partir de este, se aisló la Taq Polimerasa, utilizada en el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmentos de ADN (Lawyer *et al.*, 1989). El aislamiento se obtuvo a 70 °C y en medio con componentes orgánicos, en el que se logró observar que este microorganismo forma estructuras grandes y esféricas, además de la producción de un pigmento amarillo (Brock y Freeze, 1969). Pese a este gran avance, se ha estimado que un 99% de los microorganismos no pueden ser cultivados en laboratorio (Amann, Ludwig y Schleifer, 1995), siendo esto una limitación en la investigación científica. Es por eso que el avance en las técnicas moleculares ha permitido analizar comunidades naturales sin necesidad de cultivo, mediante la amplificación de genes específicos, entre ellos comúnmente el gen 16s ARNr (Pace, Stahl, Lane y Olsen, 1986), ya que anteriormente, cuando se utilizaban métodos microscópicos y cultivo, se revelaba de una forma excesivamente simplificada la composición microbiana presente en una comunidad (Ward, Ferris, Nold y Bateson, 1998). Las fuentes termales Octopus Springs, ubicadas en el Parque Nacional Yellowstone, fueron de las primeras fuentes termales estudiadas bajo este método, en las que se recuperó la secuencia del gen 16s ARNr proveniente de un tapete microbiano de cianobacterias (Ward, Weller y Bateson, 1990; Weller *et al.*, 1992; Ferris *et al.*, 1996). Estudios posteriores que se realizaron en el mismo sitio mostraron diversidad filogenética muy diferente a la que se tenía prevista, descubriendo

nuevos grupos filogenéticos, como los filos *Crenarchaeota* y *Korarchaeota* (Barns, Fundyga, Jeffries y Pace, 1994; Hugenholtz, Goebel y Pace, 1998).

En 1998, Jo Handelsman empleó por primera vez el término metagenómica. En su investigación utilizaron el término para hacer referencia a una colección de genomas que obtuvieron gracias a la identificación de funciones en algunas especies recuperadas a partir de ADN ambiental. Desde entonces, para el estudio de la diversidad bacteriana, se ha utilizado el gen 16s ARN ribosomal (ARNr), ya que es una región conservada en procariotas, por lo que permite la medición de relaciones filogenéticas (Woese, 1987). Pese a que se ha hablado de metagenómica desde hace ya varios años, no fue hasta el surgimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, donde el panorama de la metagenómica se transformó y potenció, ya que estas tecnologías ofrecen un aumento en el rendimiento y disminución de los costos. Además de que permitieron el estudio y la caracterización de comunidades microbianas de forma exhaustiva, incluyendo a los microorganismos no cultivables.

Costa Rica es considerada como un punto estratégico para el desarrollo de gran diversidad de especies termofílicas, debido al gran reservorio geotérmico y volcánico que surgió gracias a la formación del arco volcánico interoceánico de Costa Rica (Finsinger *et al.*, 2008). A partir de esto, se han realizado diversos estudios en fuentes termales de Costa Rica. En el 2002, el Área de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, caracterizó una cepa fotosintética de *Euglena* aislada de un parche verde en la superficie de una manifestación termal con temperaturas entre los 38 °C y 98 °C y pH entre 2 y 4. Esta manifestación termal está ubicada en Las Pailas, cerca del Volcán Rincón de la Vieja. La caracterización morfológica fue mediante microscopía electrónica y se realizaron estudios de fotosíntesis utilizando marcadores genéticos. Con este estudio se logró observar la capacidad termotolerante que posee este euglenoide (Sittenfeld *et al.*, 2002). Sin embargo, no fue hasta el 2004 cuando se realizó la descripción formal como nueva especie, denominada *Euglena pailasensis* (Sittenfeld *et al.*, 2004). El mismo grupo de investigación, junto con colaboradores de la Universidad de Fraiburgo, realizó una investigación en la que se describieron cuatro cianobacterias aisladas de una fumarola en el Parque Rincón de la Vieja, una fuente termal del campo geotérmico del Volcán Miravalles y un sitio geotérmico del Volcán Arenal. Tres de estas

cianobacterias pertenecían al género *Fischerella* y una al género *Westiellopsis* (Finsinger *et al.*, 2008).

En el 2010, se realizó la identificación de la primera especie del género *Thermocrinis* aislada del Volcán Rincón de la Vieja y se propuso el nombre de *Thermocrinis minervae* sp para esta nueva especie (Caldwell *et al.*, 2010). En este mismo sitio, Hernández – Ascencio (2012) describió la diversidad microbiana presente en este campo geotermal y naciente de aguas ácidas. Gracias a los estudios realizados en 2018 por Hynek y compañía, se observó la presencia del género *Acidiphilium* en el Volcán Poás. A su vez, se han identificado algunas bacterias, tales como *Sulfurimonas*, *Acidithiobacillus*, *Thiomonas*, *Sulfuriferula*, *Sulfuricurvum*, y *Sulfurovum*. Estas fueron aisladas de la zona hidrotermal Borbollones ubicada en el Parque Nacional Volcán Tenorio (Arce-Rodríguez *et al.*, 2019). El estudio de la diversidad microbiana realizado por Uribe–Lorío y colaboradores (2019) en fuentes termales a lo largo de Costa Rica, determinó la presencia de Cyanobacteria y Chloroflexi como filos principales, además, determinaron que tanto el pH como la temperatura se combinan para producir mosaicos de comunidades en fuentes con temperaturas que van del rango de 30 a 70 °C, siendo más importante el pH en este tipo.

El filo Chloroflexi, es un grupo de bacterias filamentosas fotoheterótrofas, que se caracterizan por poseer diversidad metabólica, así como roles ecológicos (Ward *et al.*, 2018). Los organismos fotoautótrofos son aquellos que obtienen la energía de la luz y como fuente de carbono, la materia orgánica (García *et al.*, 2011). Inicialmente, se utilizó el nombre de bacteria verde sin azufre, sin embargo, este término era erróneo ya que incluían bacterias mesófilas y termófilas quimioorganoheterótrofas así como bacterias fotolitoautotróficas (Hanada, 2014). Gracias a esta diversidad, se han detectado en una variedad de ambientes, tales como sedimentos (Speirs, Rice, Petrovski *et al.*, 2019), suelo (Costello y Schmidt, 2006), fuentes termales (Wu *et al.*, 2009; Kale *et al.*, 2013) y digestores de lodos (Kragelund *et al.*, 2007; Miura, Watanabe y Okabe, 2007).

1.2 Justificación

Utilizando la metagenómica, se han logrado descubrir enzimas y metabolitos industrialmente importantes, como las proteasas y lipasas (Simon y Daniel, 2011). Pese a los avances en la microbiología, un 99% de los microorganismos no pueden ser cultivados en laboratorio, por lo que la metagenómica tiene el potencial de resolver y entender la ecología y

estructura microbiana además de la diversidad genética (Kumar *et al.*, 2020). Por su parte, las fuentes termales son un reservorio de microorganismos con potencial biotecnológico, por lo que los análisis metagenómicos aplicados en estos sitios, resultan ser un campo promisorio para la biotecnología, ya que por ejemplo, se podrían identificar y aislar enzimas termoestables, las cuales gracias a su estabilidad a las elevadas temperaturas son utilizadas en distintos procesos biotecnológicos industriales, como en la producción de alimentos y bebidas (Reichart *et al.*, 2021, Sarmiento, Peralta y Blamey, 2015), sin embargo todavía queda mucho por estudiar. Además dada la falta de información sobre el filo Chloroflexi en fuentes termales de Costa Rica y gracias a la topografía nacional existe un reservorio de potencial insumos biotecnológicos. Dicho lo anterior, este estudio pretende obtener los porcentajes de similitud entre los MAGs pertenecientes al filo Chloroflexi encontrados en tapetes microbianos costarricenses y genomas de microorganismos de referencia pertenecientes a cepas tipo (población de microorganismos de una sola especie que descienden de una muestra en particular) mediante herramientas bioinformáticas. También, se pretende identificar genes que le podrían conferir a las bacterias del filo Chloroflexi su capacidad de sobrevivir a altas temperaturas, ya que existen pocos reportes de su presencia en este filo, por lo que se pretende aumentar el conocimiento a nivel de mecanismos moleculares. Hasta el momento, no existen datos al respecto para MAGs ensamblados de fuentes termales de Costa Rica, por lo que el presente estudio podría contribuir al conocimiento de estos microorganismos a nivel local.

1.3 Problema

Los estudios realizados en ambientes extremos, como las fuentes termales, se han enfocado en microorganismos como las cianobacterias, por lo que existe una falta de información sobre miembros del filo Chloroflexi en estos sitios, así como falta de información acerca de genes relacionados con la termotolerancia en este filo. Por lo que en la presente investigación se plantea ¿Cuál es la similitud entre los genomas de los MAGs identificados en los tapetes microbianos costarricenses y los genomas de referencia del filo Chloroflexi disponibles en bases de datos públicas? Y además, a partir de literatura y genomas de referencia se buscará la respuesta a ¿Cuáles genes relacionados con la termotolerancia están presentes en los MAGs de tapetes microbianos costarricenses?

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Analizar genomas ensamblados a partir de metagenomas clasificados dentro del filo Chloroflexi obtenidos a partir de tapetes microbianos de fuentes termales de Costa Rica utilizando herramientas bioinformáticas para la identificación de posibles genes termotolerantes.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar mediante un análisis genómico comparativo la similitud entre los MAGs clasificados dentro del filo Chloroflexi de los tapetes microbianos en estudio y genomas de referencia.
- Interpretar las relaciones entre los MAGs y los genomas de referencia disponibles en las bases de datos mediante un análisis filogenómico de genes codificantes.
- Identificar posibles genes relacionados con la termotolerancia en los MAGs y los genomas de referencia utilizados mediante la anotación de los mismos.

2. Marco teórico

2.1 Microorganismos extremófilos y fuentes termales

Los microorganismos extremófilos son capaces de vivir en ambientes extremos tales como desiertos, polos, volcanes y fosas profundas del océano. Estos ambientes extremos pueden variar en cuanto a condiciones (temperatura, pH), por lo que se clasifican según las condiciones físicas o químicas del ambiente en el que se desarrollan (Oliart – Ros *et al.*, 2016). La temperatura es uno de los factores más importantes que determina la supervivencia de ciertos microorganismos, ya que influye directamente en las características fisicoquímicas y afecta la estructura microbiana. Los microorganismos extremófilos pueden ser clasificados como psicrófilos, que son aquellos que crecen en una temperatura óptima menor a 15 °C, termófilos aquellos que crecen a temperaturas mayores a 50 °C e hipertermófilos, los que crecen a

temperaturas mayores a 80 °C (Singh *et al.*, 2019). Sin embargo, en los ambientes extremos existen también otras condiciones que afectan a los microorganismos, como lo son el pH, la concentración de sales, la radiación y la presión osmótica (Oliart – Ros *et al.*, 2016). Las fuentes termales son ecosistemas únicos dado que presentan temperaturas mayores a 35 °C (Pentecost *et al.*, 2003), y un pH que puede variar desde 0.2 a 11 (Dodds y Whiles, 2010).

2.1.1 Fuentes termales más estudiadas en el mundo

Las fuentes termales se distribuyen por todo el mundo, dentro de las más importantes, el Parque Nacional Yellowstone (PNY) ha sido reconocido por el gran número (más de 30) que posee (Wiegel y Ljungdahl, 1981; Reysenbach, Wickham y Pace, 1994; Colman *et al.*, 2016), así mismo se han realizado investigaciones en fuentes termales de otros países como Nueva Zelanda (Wahlund, Woese, Castenholz y Madigan, 1991; Strazzulli *et al.*, 2017), Japón (Yamamoto *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2019;), Chile (Alcamán-Arias *et al.*, 2018), China (Tang *et al.*, 2018; Nishiyama *et al.*, 2018; Choure *et al.*, 2021), India (Pathak y Rathod, 2014; Saxena *et al.*, 2017) y Sudáfrica (Tekere, 2011; Tekere *et al.*, 2012; Tekere, Jardine y Ubomba *et al.*, 2020).

2.1.2 Estudios en fuentes termales de Costa Rica

Según (Alvarado y Vargas, 2017), Costa Rica cuenta con 350 fuentes termales aproximadamente. Uno de los primeros estudios morfológicos consistió en la descripción de cuatro cianobacterias aisladas de una fumarola en el Parque Rincón de la Vieja, una fuente termal del campo geotérmico del Volcán Miravalles y un sitio geotérmico del Volcán Arenal. A estas cianobacterias, después de ser cultivadas en laboratorio, se les realizó una caracterización morfológica. Se lograron identificar tres especies del género *Fischerella* y la especie *Westiellopsis* sp. Como parte del estudio, se evaluó el nivel de termotolerancia para cada una de las especies mediante la exposición de estas a distintas temperaturas. También se amplificó la región del 16S ARNr de las cepas investigadas y se realizó una comparación de una secuencia nucleotídica con una base de datos de nucleótidos (BlastN) con el fin de obtener porcentajes de identidad para las secuencias. Algunas de las mejores identidades corresponden a *Oscillatoria* sp, *Fischerella major*, *Fischerella muscicola* y *Westiellopsis* sp (Finsinger *et al.*, 2008). En 2010, Caldwell y colaboradores, realizaron el aislamiento de la primera especie del género *Thermocrinis* aislada en Costa Rica, para esto se tomaron muestras de biomasa filamentosa de una fuente termal cerca del Volcán Rincón de la Vieja. Se amplificó la región del gen 16s ARNr

lo que permitió establecer que *Thermocrinis ruber* corresponde a la especie más cercana. A partir de los análisis filogenéticos y características fisiológicas, se propuso el nombre de *Thermocrinis minervae* para esta nueva especie (Caldwell *et al.*, 2010). En ese mismo sitio, se realizó otro estudio, en el que a partir de la construcción de bibliotecas basadas en el gen 16s ARNr, se determinó la presencia de Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, a su vez, se realizó la descripción de una naciente ácida cercana, en las que se identificaron los grupos Acidobacteria, α -Proteobacteria y β - Proteobacteria (Hernández – Ascencio, 2012). Otro de los sitios extremos estudiados en Costa Rica es la Laguna Caliente situada en el Volcán Poás. En este caso se describió el perfil de la comunidad microbiana allí presente mediante la secuenciación Illumina del gen 16s ARNr. Únicamente se observó la presencia del género *Acidiphilium*. Este estudio sugiere que la Laguna Caliente aloja un monocultivo y que dichos microorganismos, dada las condiciones, obtienen su energía de la oxidación de azufre en el lago (Hynek *et al.*, 2018). Otro de los enfoques que se han realizado a partir de microorganismos aislados de fuentes termales consistió en el uso de la cepa termofílica *Leptolyngbya* 7M aislada de una fuente termal cerca del Volcán Miravalles con el fin de evaluar la capacidad de tolerancia y absorción ante ciertos herbicidas, como lo son el Paraquat y el Bromacil. Se utilizó esta cianobacteria ya que gracias a estudios previos se sugiere que microorganismos en condiciones extremas son más tolerantes a estos compuestos, por lo que eventualmente podrían ser utilizados en biorremediación. De manera interesante, se observó que para reducir la viabilidad de la cianobacteria se requerían concentraciones mucho más elevadas de Paraquat en comparación con las reportadas en ambientes acuáticos de Costa Rica (Brenes-Guillén, Fuentes-Schweizer, García-Piñeres y Uribe-Lorío, 2019). En 2019 se realizó el primer reporte para Costa Rica y Centroamérica de la descripción fisicoquímica y composición microbiológica de un manantial con niveles elevados de CO₂. El sitio de estudio es la zona hidrotermal Borbollones ubicada en el Parque Nacional Volcán Tenorio. Para esto se construyeron las bibliotecas del gen 16s ARNr y se empleó secuenciación Illumina. Dada las condiciones fisicoquímicas, se evidenció que las comunidades microbianas están compuestas por especies que forman parte del ciclo del azufre. Algunas de las bacterias identificadas corresponden a *Sulfurimonas*, *Acidithiobacillus*, *Thiomonas*, *Sulfuriferula*, *Sulfuricurvum*, y *Sulfurovum*. (Arce-Rodríguez *et al.*, 2019). Por su parte, no fue hasta el estudio de Uribe – Lorío y compañía (2019) en el que se describió cómo las características geoquímicas, principalmente temperatura y pH, moldean la conformación bacteriana presente en

los tapetes microbianos encontrados en temperaturas moderadamente termofílicas. Esta investigación se llevó a cabo en las fuentes termales del campo geotermal del Volcán Miravalles, Río Negro que se encuentra asociado al Volcán Rincón de la Vieja, Bajo Las Peñas, el cual consiste en un grupo de fuentes drenadas por el Volcán Turrialba y la fuente de Rocas Calientes ubicado en la zona sur del país. El estudio de la diversidad microbiana se llevó a cabo mediante la amplificación del gen 16s ARNr por medio de pirosecuenciación 454 (Roche). A partir de esto se obtuvo que Cyanobacteria y Chloroflexi comprenden el 93% del total de las lecturas obtenidas. El filo más abundante corresponde a Cyanobacteria, excepto en Rocas Calientes, en donde predominó Chloroflexi en un 84%. Así mismo, se identificaron los fillos Proteobacteria, Bacteroidetes y Deinococcus- Thermus. En cuanto al filo Cyanobacteria, algunos de los géneros identificados fueron *Fischerella*, *Chlorogloeopsis* y *Synechococcus*, así como las especies *Leptolyngbya* sp. BX10 y *Limnothrix* sp B15. Con lo que respecta al filo Chloroflexi, algunas de las especies identificadas corresponden a *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl, *Roseiflexus castenholzii* y *Roseilinea gracile*. Adicionalmente se realizaron análisis estadísticos, en el que se evidenció una fuerte correlación entre la composición de la comunidad y las características geoquímicas. (Uribe-Lorío *et al.*, 2019). En el estudio de Brenes - Guillen y compañía (2021) se realizó una combinación de métodos de aislamiento, cultivo, caracterización morfológica y análisis moleculares para la identificación y descripción de miembros del filo Cyanobacteria. La investigación se realizó en las fuentes termales del campo geotermal del Volcán Miravalles y la fuente termal de Las Lilas ubicada cerca del río Salitral en La Fortuna. El análisis filogenético se realizó utilizando secuencias del gen 16s ARNr y el análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés). Se identificaron 14 clados (3 clados nuevos), en los cuales podría haber nuevas especies, por lo que sugiere que las fuentes termales de Miravalles y las Lilas son reservorios de nuevos linajes filogeográficos de microorganismos fototróficos (Brenes-Guillen *et al.*, 2021).

2.1.3 Principales grupos de microorganismos fotótrofos presentes en tapetes microbianos.

En las fuentes termales, los microorganismos termófilos suelen organizarse en biopelículas o tapetes microbianos sobre rocas o superficies sólidas (Stolz, 2000). Sin embargo, pueden ser encontrados en sedimentos (Panday y Das, 2010; Priya *et al.*, 2016) o de forma libre en el agua (Pask-Hughes y Williams, 1975; Narayan, Hatha, Morgan y Rao, 2008). Los tapetes microbianos

son comunidades bentónicas que se distribuyen en capas verticales y suelen desarrollarse en la interfaz líquido-sólido en distintos ambientes (Prieto-Barajas, Valencia-Cantero y Santoyo, 2018). Son sumamente organizados, ya que las células microbianas se distribuyen según su función y gradientes físico químicos (Selvarajan *et al.*, 2018). Esta estratificación se debe a los gradientes físico químicos generados por los propios microorganismos, proporcionando la formación de microambientes en los que se desarrollan diferentes grupos funcionales de microorganismos (Chiriac *et al.*, 2017). Están compuestos por una alta variedad de microorganismos los cuales se encuentran embebidos en una matriz de exopolisacáridos que permite un mayor flujo de nutrientes y energía además del intercambio de señales para la supervivencia de la comunidad (Prieto-Barajas, Valencia-Cantero y Santoyo, 2018). En la parte superior comúnmente se establecen las cianobacterias, debido a que necesitan de luz directa para realizar fotosíntesis (Cuecas, 2017). Como resultado de esta, desarrollan un papel importante en la fijación del carbono inorgánico a carbono orgánico y la liberación de oxígeno; a su vez, las cianobacterias también participan en la fijación de nitrógeno (Prieto-Barajas, Valencia-Cantero y Santoyo, 2018). En las partes inferiores de los tapetes microbianos es común encontrar bacterias del filo Chloroflexi, las cuales brindan el color rojizo al tapete (Cuecas, 2017). Además, también se pueden encontrar otras bacterias fototróficas, bacterias aeróbicas y heterótrofos anaeróbicos (Mehta y Satyanarayana, 2013).

Las cianobacterias se consideran como uno de los grupos más exitosos, desde el punto de vista ecológico, pues han logrado colonizar los hábitats más extremos como zonas desérticas, interiores de rocas, ambientes hipersalinos y zonas de alta exposición a radiación ultravioleta (Singh *et al.*, 2016). Las cianobacterias han contribuido en el carácter oxidativo de la atmósfera actual, gracias a su fotosíntesis oxigénica (Bekker *et al.*, 2004). Además, son capaces de sintetizar clorofila y pigmentos como ficobilina, ficocianina y en algunos casos ficoeritrina (Saini *et al.*, 2018). Dentro de los géneros pertenecientes al grupo de las cianobacterias, se pueden encontrar *Thermosynechococcus*, *Fischerella*, *Synechococcus* y *Leptolyngbya* en los tapetes microbianos formados en las fuentes termales (Sompong, Besley y Peerapornpisal, 2005; Mehta y Satyanarayana, 2013; Amarouche *et al.*, 2014; Uribe – Lorío *et al.*, 2019).

El género *Synechococcus* es considerado como uno de los procariotas autótrofos más abundantes en los ecosistemas, entre sus características: son Gram negativos al igual que todas las

cianobacterias, por lo que poseen una pared gruesa de peptidoglicano y están formadas por células con un diámetro menor a 2 μm . Además, poseen una capa externa de glicoproteínas, que les confiere protección ante los cambios ambientales (Callieri, 2017). En PNY se realizó un estudio de los tapetes microbianos formados a temperaturas entre los 50 °C y 75 °C, en donde se logró observar en la capa superior la cianobacteria *Synechococcus lividus* (Mehta y Satyanarayana, 2013). Otro estudio se realizó en Tailandia, en donde se logró evidenciar que *Synechococcus lividus* estuvo presente en todas las fuentes termales entre los 40 °C y 80 °C. Así mismo, *Synechococcus bigranulatus*, *Oscillatoria limosa* y *Lyngbya* sp se identificaron en fuentes termales de 30 °C (Sompong *et al.*, 2005). Por su parte, el género *Leptolyngbya*, se caracteriza por ser cianobacterias filamentosas delgadas y poseer tricomas cilíndricos (Shimura *et al.*, 2015). Estudios ecológicos de estas comunidades sugieren que variaciones en la temperatura pueden provocar cambios estacionales en las poblaciones de *Synechococcus*, sin embargo, estas comunidades son estables frente a variaciones ambientales drásticas y la diversidad biológica surge como respuesta ante dichos choques extremos (Prieto-Barajas, Valencia-Cantero y Santoyo, 2018). En Argelia se investigó la diversidad de cianobacterias formadoras de tapetes microbianos presentes en manantiales geotermales, en donde de manera general se lograron identificar 19 géneros. En los manantiales con temperaturas más elevadas (50 °C) se identificaron *Leptolyngbya*, *Synechococcus* y *Gloecapsa*; mientras que *Stigonema*, *Chroococcus* dominaron los manantiales con temperaturas más bajas (Amarouche *et al.*, 2014).

El filo Chloroflexi está conformado por bacterias filamentosas fotoheterótrofas. Se caracterizan por tener amplia diversidad metabólica y ecológica. Se pueden encontrar en ambientes como sedimentos marinos, aguas subterráneas y fuentes termales (Ward *et al.*, 2018). En el 2013, se estableció que este filo estaba compuesto por seis clases: Chloroflexi, Anaerolineae, Caldilineae, Ktedonobacteria, Dehalococcoidetdia, y Thermomicrobia (Mehta y Satyanarayana, 2013). La clase Chloroflexi está compuesta por bacterias filamentosas y cuenta con dos órdenes: Herpetosiphonales y Chloroflexales. Este último, está formado por tres familias Chloroflexaceae y Roseiflexaceae, las cuales son bacterias termofílicas aisladas de fuentes termales y la familia Oscillochloridaceae. La clase Anaerolineae está formada por bacterias filamentosas anaerobias que han sido aisladas de reactores, digestores y fuentes termales; además, comprende seis géneros: *Anaerolinea*, *Bellilinea*, *Levilinea*, *Longilinea*, *Ornatilinea* y *Leptolinea*. La clase Caldilineae está compuesta únicamente por la especie *Caldilinea aerophila*, la cual fue aislada de

un tapete microbiano en una fuente termal (Hanada, 2014). La clase Ktedonobacteria está compuesta por las familias Ktedonobacteriaceae, Thermosporotrichaceae y Thermogemmatissporaceae y han sido aisladas de suelo geotérmico (Zheng *et al.*, 2019). La clase Dehalococcoidetdia se caracteriza por la capacidad que tienen los géneros *Dehalococcoides* y *Dehalogenimonas* de deshalogenar alcanos clorados (Padilla *et al.*, 2014; Yohda *et al.*, 2017; Key *et al.*, 2018). La clase Thermomicrobia está compuesta por las familias Thermomicrobiaceae y Sphaerobacteraceae. *Thermomicrobium roseum* es parte de la familia Thermomicrobiaceae y se identifica por ser un extremófilo, de pared celular Gram negativo, aislado de una fuente termal. Además, gracias a la reconstrucción metabólica y estudios experimentales se logró evidenciar la capacidad que posee de oxidar el CO aeróbicamente, siendo el primer termófilo reportado con dicha capacidad (Wu *et al.*, 2009).

Miembros del filo Chloroflexi en la zona anoxigénica de los tapetes microbianos suelen convertirse en productores primarios, ya que en condiciones extremas de temperatura y/o pH el crecimiento de las cianobacterias es inhibido. Este filo también puede desarrollarse junto con las cianobacterias en otras fases del tapete microbiano, en este caso el crecimiento se denomina mixotrófico, en el que el CO₂ y las moléculas orgánicas son utilizadas simultáneamente como fuente de carbono (Schmidt, 2019).

2. 2 Metagenómica

La metagenómica, concepto descrito por Handelsman en 1998, se define como el análisis funcional basado en secuencias de los genomas microbianos presentes en una muestra ambiental (Handelsman *et al.*, 1998). Para el estudio de estas comunidades, desde un inicio se utilizó el gen 16S ARNr como marcador genético, ya que está presente en todos los organismos procariotas, siendo un punto clave para los análisis filogenéticos y las clasificaciones taxonómicas. Sin embargo, existen otros marcadores que se podrían utilizar, como las regiones ITS y el gen 18S ARNr, en caso de organismos eucariotas, así como genes conservados (DeCastro, Rodríguez-Belmonte y González-Siso, 2016). Los últimos 15 años aproximadamente, han sido testigos del creciente interés en la metagenómica, esto gracias a los avances tecnológicos que han permitido y facilitado realizar estudios a una mayor escala y a costos menores. La metagenómica, a través de las tecnologías de secuenciación, ha facilitado el acceso a gran cantidad de información genómica generando nuevos enfoques y descubrimientos (Almeida *et*

al., 2018). A través del tiempo se han desarrollado distintos tipos de secuenciación, los cuales han sido clasificadas por generaciones.

La primera generación corresponde a la secuenciación tipo Sanger, conocida como secuenciación por terminadores, ya que nucleótidos fluorescentes marcan los extremos de los fragmentos a secuenciar y permiten la determinación de la secuencia (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977). Otro tipo de secuenciación es la pirosecuenciación, descrita por primera vez en 1985, esta consiste en una serie de pasos enzimáticos y cuantificación mediante la detección de una señal luminosa emitida cuando se agrega un nucleótido, el cual libera pirofosfato inorgánico (Nyrén y Lundin, 1985).

La segunda generación es conocida como secuenciación de próxima generación, la cual se basa en fundamentos básicos acompañados por técnicas de alto rendimiento mediante el uso de secuenciadores y plataformas de secuenciación por síntesis (SBS) (Voelkerding, Dames y Durtschi, 2009). Los secuenciadores más reconocidos y utilizados son el secuenciador 454 de Roche, el cual utiliza la técnica de pirosecuenciación, secuenciadores Solexa fabricados por la plataforma Illumina y los secuenciadores SOLiD fabricados por Applied Biosystems, entre otros (Zhang, Chiodini, Badr y Zhang, 2011).

Recientemente se ha desarrollado la tercera generación, la cual se caracteriza por generar secuencias largas, estas nuevas tecnologías permiten reducir el tiempo de trabajo en la construcción de bibliotecas y ensamblaje de genomas (Athanasopoulou *et al.*, 2022). Esta tercera generación también emplea secuenciadores. Ejemplo de esto, es el secuenciador de molécula única Heliscope, el secuenciador Nanopore, el secuenciador Sequel II capaz de secuenciar una sola molécula en tiempo real (SMRT), entre otros (Pareek, Smoczynski y Tretyn, 2011). Este último, diseñado por Pacific Biosciences (PacBio), ofrece una alternativa a la secuenciación de segunda generación, ya que permite la secuenciación de fragmentos largos mediante la unión de adaptadores de horquilla a ambos extremos del fragmento. Esta técnica permite hacer corridas más rápidas, tiene un rendimiento mejor pero una tasa de error más alta y un costo más elevado en comparación a la secuenciación de segunda generación (Hufnagel *et al.*, 2020). Otro tipo es la secuenciación genómica de células individuales. Esta se caracteriza en que, por medio del método de amplificación de desplazamiento múltiple, se amplifica el ADN y este se utiliza como molde. Entre sus ventajas, tiene un impacto directo ya que permite secuenciar células

individuales sin necesidad de cultivo, sin embargo, se puede dar la pérdida de secuencias, así como reordenamientos en el momento de la amplificación (Gawad *et al.*, 2016).

Uno de los métodos de secuenciación más utilizados en estudios metagenómicos es el tipo *shotgun*. Con este método, el ADN es fragmentado aleatoriamente en fragmentos cortos, los cuales posteriormente se secuencian. Una vez secuenciados, se realiza el análisis bioinformático en el que el primer paso corresponde al ensamblaje, en el cual los pequeños fragmentos se comparan entre sí y mediante herramientas bioinformáticas se buscan superposiciones entre las secuencias para la reconstrucción del fragmento original (Bankier, 2001). Cuando estas secuencias superpuestas se ensamblan reciben el nombre de *contig*, el cual se refiere a una secuencia de ADN conocida que es contigua y carece de huecos o *gaps* (Clark y Pazdernik, 2013). La importancia de este método en la metagenómica radica en que permite reconstruir secuencias genómicas parciales y a partir de esto identificar relaciones filogenéticas, polimorfismos entre especies y composición taxonómica y funcional de comunidades microbianas (Chen y Pachter, 2005; Quince *et al.*, 2017). A partir del uso de la secuenciación *shotgun* en estudios de metagenómica se ha revelado información acerca de la genómica microbiana que anteriormente se ignoraba además se ha logrado una visión más clara de estas comunidades (Mehetre *et al.*, 2016).

Hace algunos años se consideraba que la recuperación de MAGs era restringida a muestras con baja diversidad microbiana, sin embargo, gracias a la secuenciación de alto rendimiento y a los avances en la bioinformática, actualmente es posible obtener MAGs de zonas con alta diversidad microbiana (Parks *et al.*, 2017). Estos MAGs usualmente resultan de microorganismos que no pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio, los cuales podrían estar relacionados con especies que no han sido aisladas ni descritas anteriormente, siendo esto una ventaja en conocer la diversidad microbiana, arqueológica y la topología general del árbol de la vida (Chen *et al.*, 2020).

Pese a lo incompleto que pueden llegar a ser los MAGs en comparación con genomas obtenidos a partir de aislamientos, estos informan acerca de los genes y rutas metabólicas presentes (Chen *et al.*, 2020), además, permiten estudiar la función ecológica de las poblaciones, esto mediante anotaciones genómicas y experimentación (Bharti y Grimm, 2021). Para la obtención de estos MAGs inicialmente se realiza el ensamblaje de las lecturas o *reads*, obtenidas a partir de la

secuenciación tipo *shotgun*, en *contigs* (Bharti y Grimm, 2021). Seguidamente se da la agrupación o *binning* de los *contigs* ensamblados que poseen una composición de secuencia similar, profundidad de cobertura y relaciones taxonómicas (Parks *et al.*, 2017). Sin embargo, el proceso de *binning* resulta ser un desafío en la metagenómica, ya que por lo general los MAGs suelen estar incompletos, por lo que pueden surgir ambigüedades en la clasificación de los contigs (Parks *et al.*, 2017), además también puede existir un vacío de información sobre los genomas de referencia por lo que la agrupación se realiza de una manera no supervisada (no utiliza secuencias de referencia) (Bharti y Grimm, 2021).

Las variaciones genéticas que ocurren dentro de las especies se pueden medir de distintas formas, tales como cambios en el número de genes compartidos, cambios en las variantes de un solo nucleótido, cambios en la similitud del genoma, entre otros. Actualmente existen grandes conjuntos de MAGs y métodos de determinación de ANI (Identidad de nucleótidos promedio), con los cuales se ha observado que altas tasas de recombinación y bajos niveles en el ANI, son indicadores de una posible subdivisión en la especie (Van Rossum *et al.*, 2020). Esto contribuye a la explicación del surgimiento de nuevos microorganismos (Fig.1).

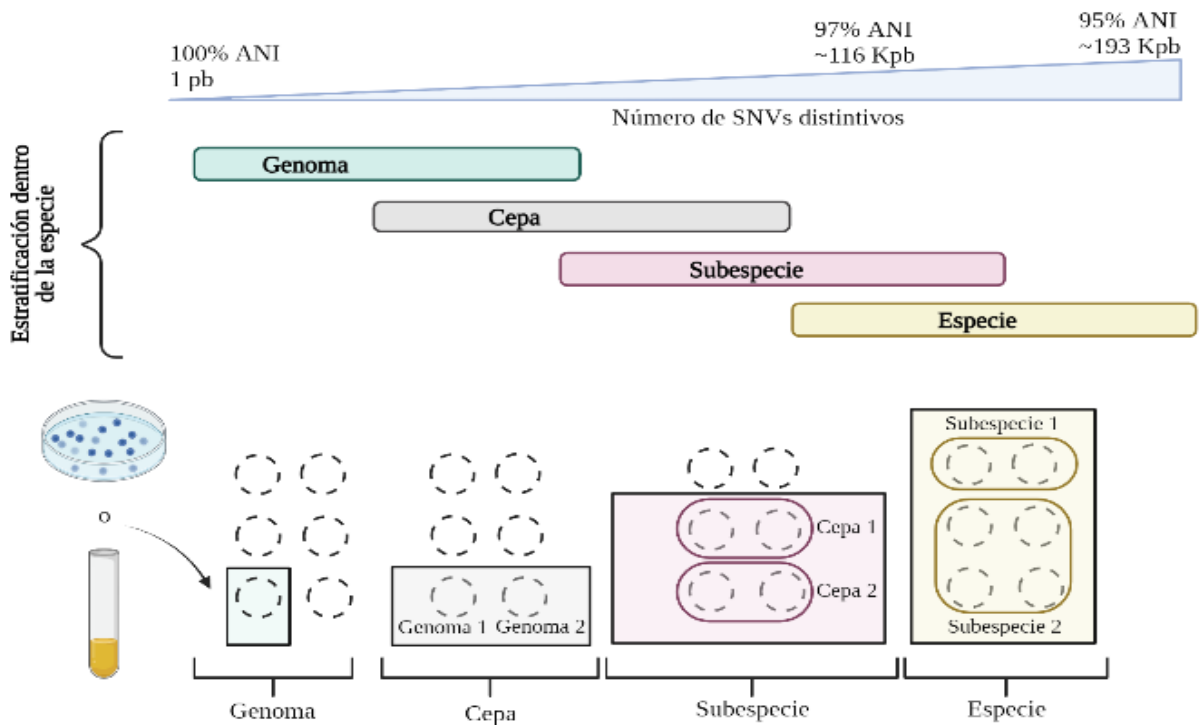


Figura 1. Estratificación intraespecífica. Un menor porcentaje de ANI (95% ANI) y un mayor número de variantes de un solo nucleótido (SNV), representa una mayor posibilidad de subdivisión en curso de una especie. Modificado de (Van Rossum *et al.*, 2020).

2.3 Análisis filogenómicos

Los análisis filogenómicos se basan en datos moleculares con los que se infieren las relaciones entre las especies, así como también toman información evolutiva de dichas especies para determinar los mecanismos de la evolución molecular (Philippe, Delsuc, Brinkmann y Lartillot, 2005). Los avances en la biología molecular han permitido el uso de secuencias y contenido de genes y anotaciones de productos genéticos para la reconstrucción de estos análisis (Kim, Nasir, Hwang y Caetano-Anollés, 2014). Uno de los objetivos de la metagenómica es obtener información acerca de relaciones filogenéticas con el fin de mejorar la clasificación, agrupación y predicción funcional de genes, además de mejorar la identificación de unidades taxonómicas operativas (OTUs) (Darling *et al.*, 2014). Los análisis filogenómicos se basan en una clasificación sistemática que permite representar las relaciones genéticas de diferentes taxones mediante la construcción de árboles filogenéticos (Mishra, 2020). Estos análisis han contribuido a ampliar el conocimiento de la filogenia del filo Chloroflexi (Sun *et al.*, 2016, Speirs *et al.*, 2019).

La caracterización de múltiples linajes ha permitido la comprensión de la diversidad microbiana y sus funciones en las comunidades (Colman, 2008). Uno de los enfoques de estos análisis es inferir las relaciones filogenéticas a partir de comparaciones de secuencias de genes y proteínas (Kunisawa, 2011). Tal es el caso de la cepa termofílica JAD2^T, aislada de sedimento de las fuentes termales de Nevada, Estados Unidos. Para los análisis filogenómicos se utilizaron los genes conservados, entre ellos: *dnaG*, *frr*, *infC*, *nusA*, *pgk*, *pyrG*, *rplA*, *rplK*, *rplL*, *rplS*, *rplT*, *rpmA*, *rpoB*, *rpsB*, *rpsI* y *smpB*. Estos colocaron a la cepa JAD2^T dentro del filo Chloroflexi, siendo el primer representante cultivado de un nuevo linaje dentro de este filo. Esta cepa se nombró como *Thermoflexus hugenholtzii* (Dodsworth *et al.*, 2014).

Otro ejemplo de estos análisis es la bacteria termófila *Thermobaculum terrenum*, aislada del PNY. El objetivo de este estudio era identificar la posición filogenética a partir de base de datos

de genes de bacterias con genomas secuenciados. Basados en esto, se encontraron tres arreglos genéticos: *musB*, *rpmE* y *surA-mazG*, los cuales están presentes únicamente en miembros del filo Chloroflexi, por lo que se concluyó que *Thermobaculum terrenum* es parte de este filo (Kunisawa, 2011). En 2019, Lily Momper y colaboradores, realizaron una investigación en la que tomaron genomas de cianobacterias disponibles y un nuevo genoma aislado de manantiales hidrotermales del PNY. Uno de sus objetivos era determinar las relaciones filogenéticas entre dichos genomas. En 2014, Gorlenko y colaboradores, determinaron que cinco monocultivos pertenecían al mismo género *Chloroflexus* y a la misma especie, esto a partir de la comparación de secuencias y los análisis filogenéticos. Dicha especie fue nombrada como *Candidatus* “Chloroplaca asiática”.

2.4 Termotolerancia

La termotolerancia se define como la capacidad de una célula u organismo para sobrevivir a temperaturas altas. De manera general, la resistencia al calor está mediada por una serie de factores como lo son: presencia de proteínas de estrés, chaperonas, proteínas termoestables, compuestos termoprotectores y composición de la pared celular (Macario, 2007). En cuanto a condiciones fisiológicas, en las especies termófilas se ha visto la tendencia hacia una menor insaturación de los ácidos grasos, así como la disminución en número en las cadenas de éstos para controlar la fluidez de la membrana (Brininger *et al.*, 2018). Para que exista dicha capacidad existen genes termotolerantes que son indispensables en la supervivencia a temperaturas altas (Červený, Sinetova, Zavřel y Los, 2015). En muchas ocasiones, la expresión de estos genes se debe a la respuesta de choque térmico que utilizan los organismos para restaurar la homeostasis ante cambios y otras condiciones ambientales. Esta respuesta implica la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) (Rajaram y Apte, 2008).

No se ha encontrado evidencia con respecto a mecanismos utilizados ante la exposición a altas temperaturas en el filo Chloroflexi, sin embargo, en las cianobacterias algunos mecanismos son la protección del fotosistema II, expresión del factor *o32* y protección de la membrana tilacoidal. La actividad del fotosistema II, ha sido utilizado como un indicador sensible e inmediato de daño térmico en organismos fotosintéticos ya que es susceptible a la inactivación por calor (Kimura *et al.*, 2002). Varios estudios sugieren que las HSP protegen directamente la actividad fotosintética contra la inactivación térmica mediante la estabilización de la membrana y solubilización de

agregados dentro de la célula en el proceso fotosintético (Chatterjee *et al.*, 2020). La expresión de las HSP depende de la función del gen *rpoH* (*htpR*), el cual codifica un factor sigma (σ^{32}) que permite a la ARN polimerasa reconocer los promotores para genes de choque térmico y regular su expresión. Se ha observado que, tras un aumento de temperatura, los niveles del factor sigma aumentan y con esto la inducción de las HSP como resultado (Wang y Kaguni, 1989). El último mecanismo corresponde a la protección de la membrana tilacoidal por parte de las HSP. La membrana tilacoidal es objetivo de daño por calor en organismos fotosintéticos por lo que las HSP se encargan del replegamiento, preservación de la integridad funcional y el mantenimiento de la estabilidad de dicha membrana ante el estrés térmico (Bernfur *et al.*, 2017).

3. Marco metodológico

3.1 Obtención, depuración y clasificación taxonómica de MAGs

Esta investigación tuvo como objeto de estudio 74 MAGs dentro del filo Chloroflexi provenientes de 14 fuentes termales de Costa Rica. Estos MAGs fueron ensamblados previamente por el equipo de investigación de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación de Biología Molecular y Celular, Universidad de Costa Rica. Los valores de pH y temperatura donde fueron colectados los tapetes microbianos se encuentran en el cuadro 1. La extracción de ADN ambiental se realizó mediante el kit de extracción Nucleospin soil y la secuenciación de dicho ADN se llevó a cabo en la plataforma HiSeq 4000 (Illumina Inc.) utilizando los servicios de la empresa Macrogen, ubicada en Corea. En cuanto al análisis bioinformático, el primer paso correspondió al análisis de calidad de los datos de secuenciación, para esto se utilizaron los programas FastQC v0.11.7 (Andrews, 2010) y Trimmomatic v0.32 (Bolger, Lohse y Usadel, 2014). Para el ensamblaje, se utilizó la herramienta MEGAHIT v1.1.2. Posteriormente se utilizó ANVIO v6.1 (Eren *et al.*, 2015) para generar los MAGs. Se utilizó el programa CheckM v1.0.18 (Parks *et al.*, 2015) como herramienta de análisis de calidad de los MAGs. Solamente se utilizaron los MAGs que tuvieran > 60% de completitud y <10% de redundancia, valores que son utilizados como referencia para secuencias de calidad media y alta (Bowers *et al.*, 2017). Se utilizó GTDB-Tk v0.1.4 (Chaumeil, Mussig y Hugenholtz, 2019) y la base de datos GTDB v.95 con el fin de obtener la clasificación taxonómica de los MAGs. Por

último, se realizó la asignación taxonómica de genes 16S ARNr por medio de la plataforma de EzBiocloud.net (Yoon *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Temperatura y pH de las 14 fuentes termales de Costa Rica.

Muestra	Localización	Temperatura °C	pH
Salitral	Cordillera de Tilarán	59.8	6.1
R.Naranjo	Cordillera de Tilarán	34.9	6.5
La Luz	Volcán Miravalles	49.9	5.2
Miravalles	Volcán Miravalles	51.0	7
Las Lilas	Volcán Rincón de la Vieja	74.0	6
Rocas Calientes 1	Volcán Miravalles	63.0	6
Hornillas	Volcán Miravalles	48.0	6.0
Río Perdido	Volcán Miravalles	58.1	6.4
VP-TO1	Río San Rafael	56.7	6.2
VP-TO2	Río San Rafael	36.9	6.8
VP-TO4	Río San Rafael	64.2	6.1
VP-TI-1-Tucanito	Río San Rafael	48.8	7
VP-BT.	La Palmera	40.6	6
VP-FC	La Palmera	43.3	6.1

3.2 Creación de bases de datos de genomas del filo Chloroflexi

Para la creación de bases de datos de genomas del filo Chloroflexi, se buscaron los genomas de referencia desde la base de datos del NCBI (143 genomas). A partir de estos genomas, se construyó un cuadro con la información clave como número de acceso, sitio de aislamiento, número de *contigs*, contenido de GC y fuentes bibliográficas asociadas (Anexo 1). Además, cada uno de los genomas fueron anotados estructural y funcionalmente por medio de Prokka v1.14.5 (Seeman, 2014), con el fin de utilizar las secuencias proteicas en el análisis filogenómico.

3.3 Análisis genómico comparativo utilizando ANI

El análisis genómico comparativo se realizó mediante el cálculo de identidades de nucleótidos promedio por pares (ANI). ANI calculator es una herramienta que compara dos secuencias de genomas procariotas y brinda un porcentaje de similitud basada en la comparación

de nucleótidos. Esta herramienta forma parte de EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017). Los resultados se colocaron en el anexo 2, 3, 4, 5 y 6 en donde se detallan los porcentajes de identidad obtenidos.

3.4 Análisis filogenómico y filogenético

Para realizar el análisis filogenómico, se tomaron los MAGs y se anotaron utilizando el software Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014). Seguidamente se seleccionaron los archivos de secuencias de proteínas (.faa) para cada uno de los MAGs y se utilizó Orthofinder v2.3.3, el cual permite inferir las relaciones filogenéticas por medio de la identificación de ortogrupos y genes ortólogos, (Emms y Kelly, 2015). Las secuencias se concatenaron en una sola alineación mediante múltiples Secuencias de Comparación por Expectación Log (MUSCLE) para realizar alineaciones de secuencia múltiple (MSA). Se utilizó FastTree para la inferencia del árbol (Price, Dehal y Arkin, 2010), y se visualizó mediante las herramientas Fig Tree v1.4.4 (Rambaut, 2012) y iTOL (Letunic y Bork, 2021).

Posteriormente, se tomaron las secuencias del gen 16s ARNr de los 26 MAGs que tenían este gen, para generar un archivo multifasta. En Mega X v10.1.1 (Kumar *et al.*, 2018), se realizó un alineamiento de dicho archivo mediante el algoritmo de Clustal. El análisis filogenético se realizó utilizando el enfoque bayesiano (Mr.Bayes v3.2.7), el cual permite obtener modelos filogenéticos y evolutivos (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se utilizó el modelo TN93+G, con aproximación gamma y 1000 iteraciones. Se visualizó mediante Fig Tree v1.4.4 (Rambaut, 2012).

3.4 Búsqueda de genes relacionados con la termotolerancia

La información en microorganismos extremófilos con respecto a genes termotolerantes es escasa. Por ende, se decidió utilizar como referencia un microorganismo modelo, el cual permitió identificar posibles genes relacionados con la termotolerancia por medio de ensayos *knockout*. Para la búsqueda de estos genes se utilizó como referencia el artículo de Murata y colaboradores (2018), en el que identificaron 21 genes termotolerantes en *Escherichia coli*, los cuales se suman a la lista de 51 genes termotolerantes identificados en un estudio previo realizado por los mismos autores. De esta lista, se seleccionaron únicamente 10 genes, bajo el criterio de que formaran

parte de un operón (Anexo 2). Los genes identificados se buscaron en los archivos de secuencias de proteínas (.faa) para cada uno de los MAGs y se colocaron en el cuadro de presencia o ausencia (Cuadro 7, 8 y 9). Para determinar las regiones conservadas, se realizaron alineamientos mediante el algoritmo de clustal y se visualizaron en Jalview v2.11.1.4 (Waterhouse *et al.*, 2009), además se utilizó la base de datos InterPro v86.0 como referencia para la búsqueda de los diferentes dominios (Apweiler *et al.*, 2000).

4. Resultados

El *binning* de los metagenomas de 14 fuentes termales de Costa Rica dio como resultado la separación de 74 MAGs dentro del filo Chloroflexi. A continuación, se muestra la información correspondiente a cada MAG, en cuanto a completitud y contaminación obtenidos mediante CheckM, la clasificación taxonómica obtenida por medio de GTDB-Tk y la similitud de las secuencias del gen 16S ARNr (Cuadro 2). Se planteó que el análisis de calidad realizado por CheckM fuera mayor a 60% de completitud sin embargo se obtuvieron porcentajes mayores a 70%, lo que muestra que se logró recuperar MAGs de media-alta calidad. A nivel de resolución taxonómica de los datos, la clase predominante identificada en las fuentes termales es Anaerolineae, seguido de Chloroflexia, posteriormente Thermoflexia, Tepidiformia, Caldilinea y Ktedonobacteria.

Cuadro 2. Descripción de completitud, contaminación, clasificación taxonómica y similitud de las secuencias del gen 16S ARNr de 70 MAGs dentro del filo Chloroflexi en 14 fuentes termales de Costa Rica.

Muestra	Completitud	Contaminación	GTDB-TK	Secuencia ID_16S (% similitud)	Número accesión (sec-referenci a)
MAG56-H	84.33	2.42	c__Dehalococcoidia;o__UBA2991;f__UBA2991;g__G233;		

MAG12-RC1	94.55	2.73	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__UBA2796;g__CP2-2F;s__	Clona de bacteria Chloroflexi no cultivada Alchichica_AQ1_1_1B_10 (96 %)	JN825477
MAG15-Luz	94.55	1.82	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__UBA2796;g__CP2-2F;s__		
MAG24-Luz	89.09	6.09	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__Anaerolineaceae;g__Bellilinea;s__	Bellilinea caldifistulae GOMI-1 (99.51)	BBXX010000.16
MAG31-M	98.18	0.91	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__OLB14;s__	Anaerolineae KIST-JJY023 (97.84%)	EF594055
MAG7-S	99.09	7.04	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA5195;s__	Anaerolinaceae 1E4OTU17/APA (98.67%)	AM902609
MAG19-S	88.18	0.18	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__A4b;g__OLB15;s__	Anaerolineae SM2G06	AF445738
MAG6-R.N	82.73	0.18	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__A4b;g__OLB15;s__	Anaerolineae SM2G06 (98.23%)	AF445738
MAG24-VP-F C	96.97	3.82	c__Anaerolineae;o__UBA4142;f__UBA4142;g__;s__	Caldilineales ASNR-12 (95.67%)	GQ356103
MAG25-VP-F C	88.89	0.89	c__Anaerolineae;o__UBA4142;f__UBA4142;g__UBA4142;s__	Caldilineales TDB12 (95.64%)	FJ793157
MAG48-VP-B T	97.88	5.76	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA8950;s__	Anaerolinaceae 1E4OTU17/APA (95.22%)	AM902609
MAG36-VP-T O-4	99.09	4.55	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__UBA6663;g__;s__	Anaerolinaceae PK28 (94.32%)	AY555781

MAG46-VP-T O-4	92.73	3.82	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__UBA2796;g__CP2-2F;s__	Clona de bacteria Chloroflexi no cultivada Alchichica_AQ1_1_1B_10 (95.65%)	JN825477
MAG90-VP-T O-4	98.18	0.91	c__Anaerolineae;o__UBA4142;f__UBA4142;g__;s__	Anaerolinaceae KIST-JJY023 (97.84%)	EF594055
MAG58-VP-F C	83.94	2.91	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA12294;		
MAG26-VP-F C	99.09	2.91	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;		
MAG102-VP- FC	88.12	4.55	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;		
MAG51-VP-B T	99.09	2.91	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;		
MAG46-VP-B T	80.47	5.9	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA5796;		
MAG43-VP-B T	73.03	0.91	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA12294;		
MAG2-VP-BT	79.83	3.92	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;		
MAG38-VP-T O4	70	5	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;		
MAG27-VP-T O-4	96.36	1.36	d__Bacteria;p__Chloroflexota;c__Anaerolineae;		

MAG35-VP-T O4	95.45	0.91	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__A4b;		
MAG71-VP-T O-2	98.18	3.94	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA8950;s__	Anaerolinaceae 1E4OTU17/APA (93.53%)	AM902609
MAG75-VP-T O-2	92.91	3.36	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__g__s__	Anaerolinaeles MS4-83 (94.61%)	GQ354942
MAG43-RP	99.09	2.73	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__OLB14;s__	Anaerolinaceae KIST-JJY023 (97.77%)	EF594055
MAG51-VP-T O-1	88.64	1.11	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__A4b;		
MAG64-VP-T O1	94.55	2.73	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__UBA2796;g__CP2-2F;		
MAG8-VP-T O1	74.94	12.27	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA12294;		
MAG57-VP-T O1	80.61	2.73	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__RBG-16-51-16;		
MAG56-VP-T O1	61.26	6.41	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;		
MAG10-H	96.82	5.03	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__Fen-1038;		
MAG2-H	97.27	1.82	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__Fen-1038;		

MAG4-H	90.91	2.07	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__OLB14;		
MAG27-H	69.84	4.75	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;		
MAG21-H	84.17	7.37	c__Anaerolineae;o__UBA4142;f__UBA4142;g__UBA4142;		
MAG109-VP-TO2	72.53	5.45	c__Anaerolineae;o__SBR1031;f__A4b;		
MAG92-VP-TO2	60.04	1.62	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__OLB14;		
MAG67-VP-TO2	95.45	8.18	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA5195;		
MAG70-VP-TO2	92.73	3.82	c__Anaerolineae;o__Anaerolineales;f__envOPS12;g__UBA12294;		
MAG66-VP-TO1	74.96	1.21	c__Anaerolineae;o__Caldilineales;		
MAG1-RC1	98.18	6.92	c__Anaerolineae;o__Caldilineales;f__Caldilineaceae;g__Caldilinea;s__	Clona de bacteria no cultivada Tat-08-003_12_54 (98.08%)	MH938164
MAG13-Luz	98.18	1.82	c__Anaerolineae;o__Caldilineales;f__Caldilineaceae;g__Caldilinea;s__		
MAG5-VP-TO-1	78.96	7.83	c__Anaerolineae;o__Caldilineales;f__Caldilineaceae;g__Caldilinea;s__		

MAG4-VP-T O4	90.91	2.99	c__Anaerolineae;o__Caldilineales;	Caldilineae P3-b19 (94.61%)	JQ072920
MAG14-Luz	99.69	0.47	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Roseiflexaceae;g__Roseiflexus;s__		
MAG26-S	98.74	0.47	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Roseiflexaceae;g__Roseiflexus;s__		
MAG10-S	99.69	7.55	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Chloroflexaceae;g__Chloroflexus;s__	Anaerolineales HWB2224-2-59 (95.28%)	HM243857
MAG4-VP-T O-1	99.69	2.67	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Roseiflexaceae;g__Roseiflexus;s__		
MAG15-VP-B T	94.97	3.3	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Roseiflexaceae;		
MAG55-VP-T O1	99.69	0.94	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Chloroflexaceae;g__Chloroflexus;		
MAG23-RC1	79.61	22.63	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Chloroflexaceae;g__Chloroflexus		
MAG42-VP-T O4	99.69	0.94	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Chloroflexaceae;g__Chloroflexus;s__		
MAG8-RC1	93.86	8.21	c__Dehalococcoidia;o__UBA2991;f__UBA2991;g__G233;s__	Tepidiforma bonchosmolovskaya (98.42%)	MN264258

MAG53-Luz	85.81	5.94	c__Dehalococcoidia;o__UBA2991;f__UBA2991;g__G233;s__	Tepidiforma bonchosmolovskaya e (98.66%)	MN264258
MAG85-M	93.08	4.46	c__Dehalococcoidia;o__UBA2991;f__UBA2991;g__G233;s__		
MAG38-VP-T O-1	96.7	6.66	c__Dehalococcoidia;o__UBA2991;f__UBA2991;g__G233;s__	Tepidiformia bonchosmolovskaya e 3753O (98.59%)	MN264258
MAG26-VP-T O4	94.72	0.09	c__Dehalococcoidia;o__SM23-28-2;f__RBG-16-64-32;		
MAG122-VP-TO2	60.07	1.98	c__Dehalococcoidia;o__UBA2991;f__UBA2991;g__G233;s__	Tepidiforma bonchosmolovskaya e 3753O (98.66%)	MN264258
MAG78-H	75.05	1.19	c__Ktedonobacteria;o__Ktedonobacteriales;		
MAG26-RC1	92.27	0	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;f__;g__;s__	Uncultured Chloroflexi bacterium clone SM1F10 (94.43%)	AF445692
MAG3-Luz	97.73	4.22	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;f__;g__;s__	Anaerolineales HWB22224-2-59 (95.56%)	HM243857
MAG80-M	96.82	0.91	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;f__;g__;s__	Clona de bacteria no cultivada Tat-08-003_12_54	GU437328
MAG2-L	96.36	0.91	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;f__Thermoflexaceae;g__Thermoflexus;s__	Thermoflexus hugenholtzii JAD2(T) (98.93%)	FYEK01000008

MAG1-L	90.45	4.73	c__Anaerolineae;o__;f__;g__;s__ -		
MAG29-H	100	4.09	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;f__Fen-1058;g__;s__	Anaerolineales TSCOR003_K24	AB486946
MAG65-VP-TO1	68.22	2.99	c__Anaerolineae;o__Thermoflexales;		
MAG80-VP-TO4	85.48	4.72	c__Chloroflexia;o__Chloroflexales;f__Chloroflexaceae;		
MAG95-VP-TO2	65.3	3.59	c__Anaerolineae;o__UBA4142;f__UBA4142;g__;s__	Caldilineales ASNR-12 (95.67%)	GQ356103

El número de MAGs encontrado en cada metagenoma se detalla en la figura 2, en la que se observan los sitios en los que se realizaron los muestreos, así como el número de MAGs encontrados en cada sitio, clasificados según la clase a la que corresponden. Como se puede observar en la figura 2, en el sitio Tucano 1 (VP-TO1) se identificaron 10 MAGs, siendo esta la mayor cantidad ensamblada en los metagenomas. A nivel de resolución taxonómica, en los sitios La Luz, Rocas Calientes, Tucano 1 (VP-TO1) y Tucano 4 (VP-TO4), se identificaron cinco de las seis clases del filo Chloroflexi identificadas en este estudio. Es importante destacar el sitio Las Lilas, que se caracteriza por su elevada temperatura (75 °C) y alta concentración de sales, condiciones que favorecen la presencia de la clase Thermoflexia. A su vez destacar el sitio Rocas Calientes, que en estudios previos se ha evidenciado la presencia del filo Chloroflexi.

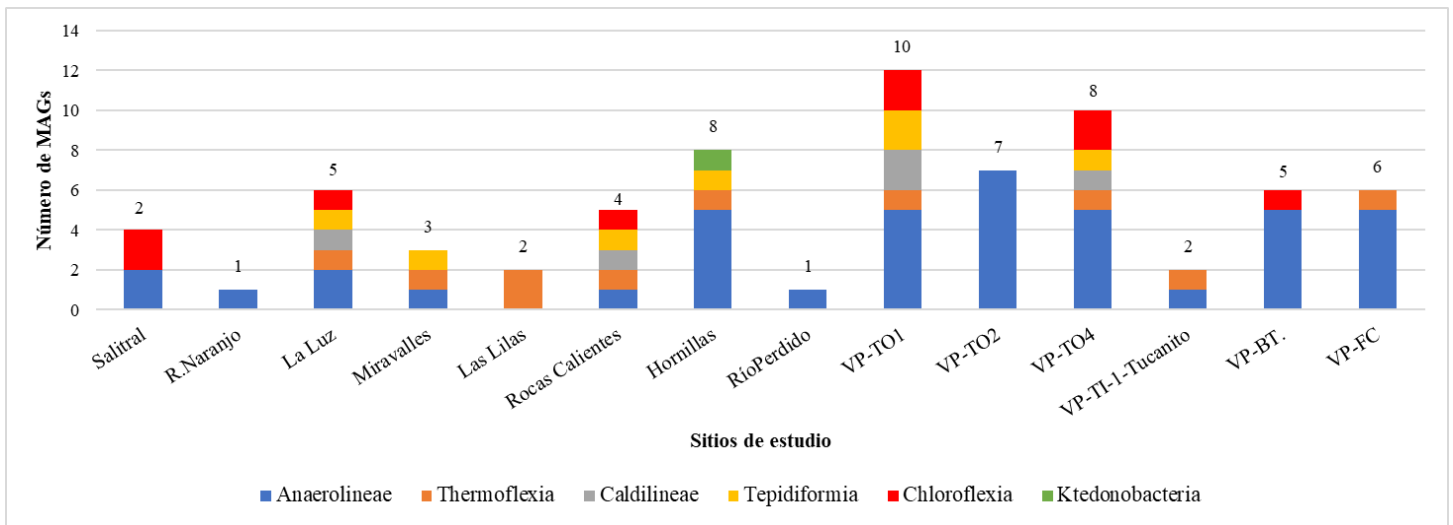


Figura 2. Cantidad de MAGS dentro de las clases del filo Chloroflexi en 14 fuentes termales de Costa Rica.

De los 143 genomas clasificados dentro del filo Chloroflexi que se encontraron en las bases de datos (Anexo 1), se presentan los que se utilizaron en el análisis filogenómico, los cuales fueron utilizados como referencia en este estudio. Dichos genomas fueron recuperados de microorganismos de distintos ambientes, como fuentes termales, aguas dulces, sitios contaminados, suelos, aguas subterráneas, sedimentos hidrotermales, entre otros, así como en condiciones mesofílicas y termofílicas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción de genomas del filo Chloroflexi obtenidos en las bases de datos del NCBI utilizados como referencia en este estudio.

Genoma	Sitio / ambiente	Cita bibliográfica asociada
Chloroflexus sp. Y-396-1	Vida libre / Mesófilo.	
Chloroflexus sp. MS-G	Fuentes termales de Mushroom Spring, PNY (60°).	Thiel <i>et al.</i> , 2014.
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	Fotótrofo termofílico. Temperatura óptima: 52-60. Viven en fuentes termales con pH neutro hasta ácido.	
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> Y-400-fl	Sin reportes disponibles.	
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> UBA8861	Sin reportes disponibles.	
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195	Mesofílico. Anaerobio. Temperatura óptima: 35°. Se encuentran en lugares contaminados.	Yohda <i>et al.</i> , 2017.
<i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM44963	Temperatura óptima: 31 °C. Aislado de suelo, Italia.	Chang <i>et al.</i> , 2011.
<i>Oscillochloris trichoides</i> DG-6	Temperatura óptima: 28-30. Aislado de mat microbiano en manantial con sulfuro de hidrógeno, Rusia.	Kuznetsov <i>et al.</i> , 2011.
<i>Kallotenue</i> CFH73958	Sedimento de fuente termal, China.	
<i>Anaerolinea thermophila</i> UN11	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de lodo en aguas residuales, Japón.	Sekiguchi <i>et al.</i> , 2003.
<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM94895	Agua dulce. Aislado de fuente termal, Japón (55 °C).	Hanada <i>et al.</i> , 1995.

<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM13941	Aislado de mat microbiano en fuente termal, Nakabusa, Japón. Marino. Temperatura 50 °C.	Hanada <i>et al.</i> , 2002.
<i>Dehalogenimonas formicexedens</i>	Temperatura óptima 32 °C. Aislado de agua subterránea contaminada.	Key <i>et al.</i> , 2017.
<i>Bellilinea caldifistulae</i> GOMI1	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de lodo digestor termofilico, Niigata, Japón.	Yamada <i>et al.</i> , 2007.
<i>Thermoflexus hugenholtzii</i> JAD2	Temperatura óptima: 75 °C. Aislado de sedimento Great Boiling Spring, Nevada, Estados Unidos.	Dodsworth <i>et al.</i> , 2014.
<i>Chloroflexus islandicus</i>	Termofilico. Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de una suspensión de agua y arena del géiser, Iceland.	Gaisin <i>et al.</i> , 2017.
<i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535	Termofilico. Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de césped de azufre en fuente termal, Nakao, Japón.	
<i>Tepidiforma bonchosmolovskayae</i>	Aislado de fuente termal, Rusia.	Kochetkova <i>et al.</i> , 2020.
<i>Brevefilum fermentans</i>	Sin reportes disponibles.	Mcllroy <i>et al.</i> , 2017.
<i>Ornatilinea apprima</i>	Temperatura óptima: 43.5 °C. Aislado de un pozo de agua caliente, Rusia.	Hemp <i>et al.</i> , 2015.
<i>Levilinea saccharolytica</i>	Temperatura óptima: 37 °C.	Hemp <i>et al.</i> , 2015.

En 26 MAGs se identificó el gen 16s ARNr. En el análisis filogenético (Fig. 3) se logró asociar 6 MAGs a cepas tipo dentro del filo Chloroflexi, 9 MAGs a bacterias del filo Chloroflexi no cultivadas, y 11 MAGs se asociaron a cepas de bacterias no cultivadas, lo que sugiere que son especies que aún no han sido descritas. Por otro lado, las 26 secuencias del 16S asociadas a los MAGs poseen porcentajes de identidad > 90% con respecto a las cepas, o clonas del filo Chloroflexi. Se logró corroborar que el rango de temperatura en la que se identificó cada clase coincide con lo reportado en la literatura. A continuación, se describen las clases dentro del filo Chloroflexi que fueron identificadas en este estudio mediante MAGs, así como las temperaturas en que se encontraron en este estudio y las reportadas.

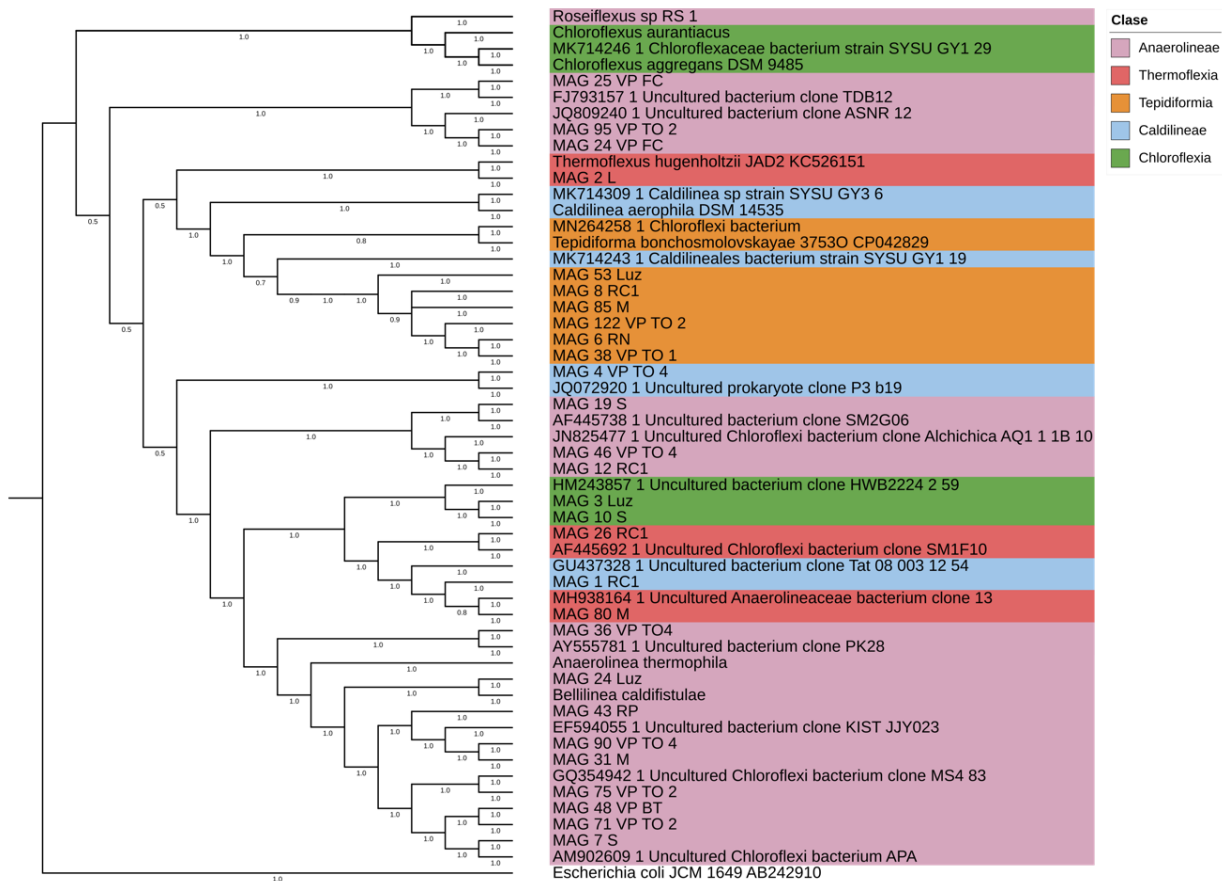


Figura 3. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr relacionadas con el filo Chloroflexi en un conjunto de datos de 27 MAGs de fuentes termales de Costa Rica. Las lecturas del gen 16S ARNr relacionadas con el filo Chloroflexi se asignaron a niveles taxonómicos en función de bases de datos de calidad controlada. Modelo TN93+G, con aproximación gamma. Números de acceso de las secuencias de referencia se incluyen en el árbol. *Escherichia coli* fue elegida como grupo externo. Los valores de bootstrap basados en 1000 iteraciones.

Basado en el análisis filogenómico, en la clase Anaerolineae se identificaron un total de 40 MAGs, en la clase Chloroflexia 11 MAGs, en la clase Caldilineae 5 MAGs, en la clase Tepidiformia 7 MAGs, en la clase Thermoflexia 10 MAGs y en la clase Ktedonobacteria 1 MAGs (Fig.4). A su vez se puede observar los sitios y la temperatura (° C) en los que se identificaron cada MAGs. Estos datos corroboran la información brindada en la figura 2.

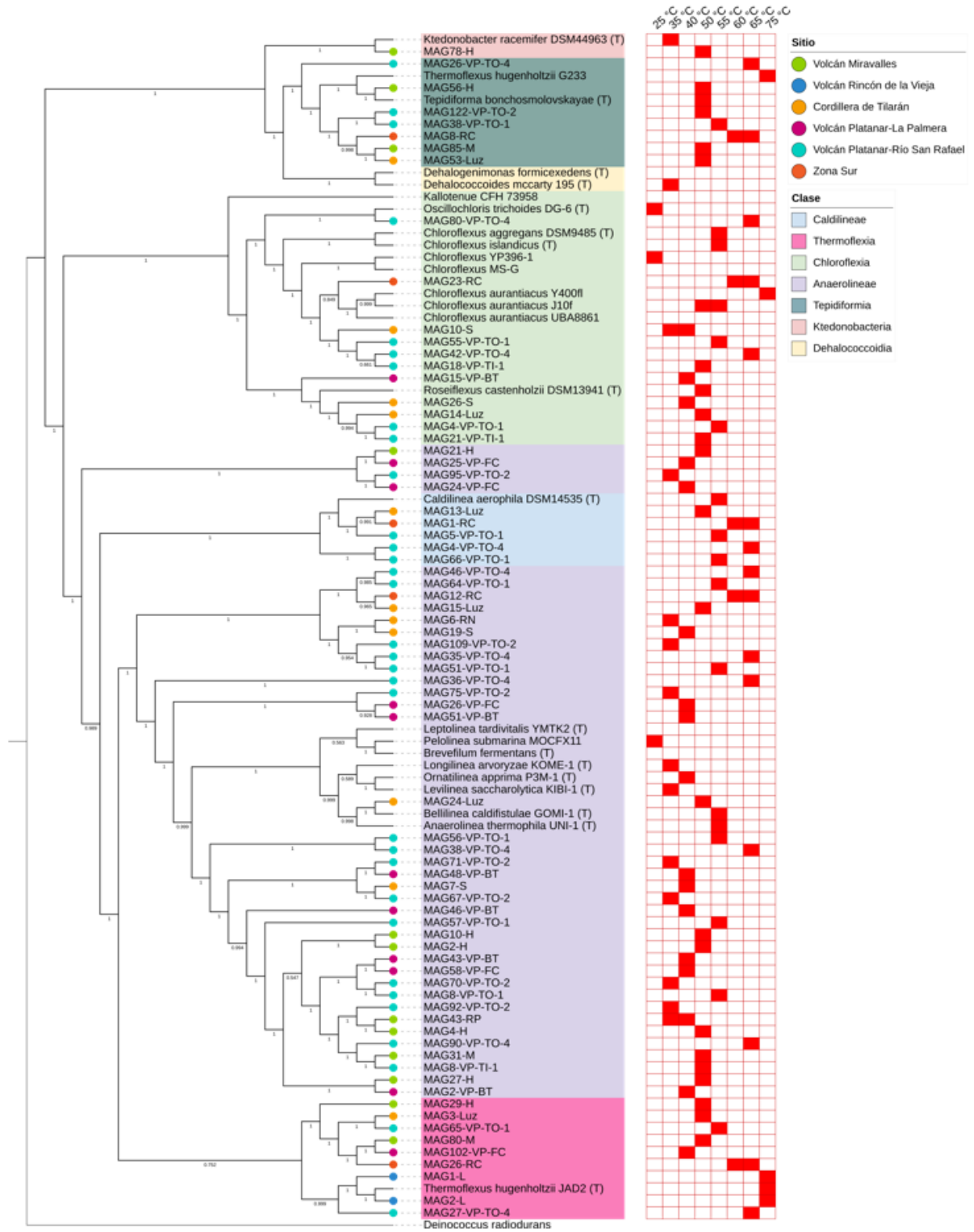


Figura 4. Filogenia de los MAGs dentro del filo Chloroflexi. Árbol filogenómico construido a partir de 24 genomas de referencia completos y los 74 MAGs en estudio con una completitud

>60% y <10% de redundancia (1456 ortogenes de copia única). Las barras de colores hacen referencia a cada una de las clases del filo Chloroflexi. En círculos de colores se presenta la distribución de cada uno de los MAGs según la leyenda que se muestra en la parte superior derecha. La temperatura (°C) registrada para cada MAGs se presenta en cuadros rojos junto a cada nombre.

Cuadro 4. Comparación de rangos de temperatura en las clases del filo Chloroflexi, entre lo reportado y lo estudiado.

Clase	Rango de temperatura reportado (°C)	En este estudio °C
Ktedonobacteria	Meso/Termófilos (17-40) <i>Thermosporothrix hazakensis</i> (31-58)	50
Tepidiformia	Termófilos (42 - 60)	35-60
Chloroflexia	Meso/termófilos moderados (35-65)	40-60
Caldilineae	Termófilos moderados (37-65)	50-60
Anaerolineae	Meso/Termófilos moderados (40-60)	35-60
Thermoflexia	Termófilos (75)	40-75

Termotolerancia

Para identificar los posibles genes relacionados con la termotolerancia en los MAGs y los genomas de referencia, se utilizó como antecedente los genes de tolerancia a altas temperaturas propuestos por Murata y colaboradores (2018) en *Escherichia coli*. En su estudio se describen un

total de 72 genes esenciales para la supervivencia en elevadas temperaturas, se caracterizan por cumplir funciones de estabilización de membrana o funciones metabólicas. Algunos de estos genes se distribuyen en operones, de los cuales se seleccionó el operón *dnaK*, el operón *atp* y el operón *ruvCAB*. En el operón *dnaK* se seleccionaron los genes *hrcA*, *grpE*, *dnaK* y *dnaJ*. En el operón *atp*, los genes *atpA*, *atpG* y *atpD* y en el operón *ruvCAB*, los genes *ruvC*, *ruvA* y *ruvB*.

Operón *dnaK*

Comprende los genes *hrcA*, *grpE*, *dnaK* y *dnaJ*; en el cuadro 5 se observa la presencia o ausencia de los genes en los respectivos MAGs.

Cuadro 5. Presencia de los genes *hrcA*, *grpE*, *dnaK* y *dnaJ* en los 70 MAGs y los 6 genomas de referencia correspondientes a cada clase del filo Chloroflexi. La equis significa presencia del gen y el color rojo ausencia del mismo.

	<i>hrcA</i>	<i>grpE</i>	<i>dnaK</i>	<i>dnaJ</i>		<i>hrcA</i>	<i>grpE</i>	<i>dnaK</i>	<i>dnaJ</i>
Anaerolineae/MAG12-RC1	x	x	x	x	Anaerolineae/MAG8-VP-TO1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG1-L	x	x	x	x	Anaerolineae/MAG90-VP-TO4	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG10-H	x	x	x	x	Anaerolineae/MAG92-VP-TO2	x			
Anaerolineae/MAG109-VP-TO2	x	x	x	x	Anaerolineae/MAG95-VP-TO2	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG15-Luz	x	x	x	x	<i>Anaerolinea thermophila</i> UN1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG19-S	x	x	x	x	Caldilineae/MAG1-RC1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG2-H	x	x	x	x	Caldilineae/MAG13-Luz	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG2-VP-BT	x	x	x	x	Caldilineae/MAG4-VP-TO4	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG21-H	x	x	x	x	Caldilineae/MAG5-VP-TO1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG24-Luz	x	x	x	x	Caldilineae/MAG66-VP-TO1			x	x
Anaerolineae/MAG24-VP-FC	x	x	x	x	<i>Caldilinea aerophila</i> DSM14535	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG25-VP-FC	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG10-S	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG26-VP-FC	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG14-Luz	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG27-H	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG15-VP-BT	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG27-VP-TO4	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG23-RC1			x	
Anaerolineae/MAG31-M	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG26-S	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG35-VP-TO4	x			x	Chloroflexia/MAG42-VP-TO4	x	x	x	x

Anaerolineae/MAG36-VP-TO4	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG55-VP-TO1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG38-VP-TO4	x	x	x	x	Chloroflexia/MAG80-VP-TO4	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG4-H	x	x	x	x	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J10f	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG4-VP-TO1	x	x	x	x	Ktedonobacteria/MAG78-H	x	x		x
Anaerolineae/MAG43-RP	x	x	x	x	<i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM44963	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG43-VP-BT		x		x	Tepidiforma/MAG122-VP-TO2				x
Anaerolineae/MAG46-VP-BT	x	x	x	x	Tepidiformia/MAG26-VP-TO4	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG46-VP-TO4	x	x	x	x	Tepidiformia/ MAG85-M	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG48-VP-BT	x	x	x	x	Tepidiformia/MAG8-RC1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG51-VP-BT	x	x	x	x	Tepidiformia/MAG38-VP-TO1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG51-VP-TO1	x	x	x	x	Tepidiformia/MAG53-Luz	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG56-VP-TO1		x	x	x	Tepidiformia/MAG56-H	x		x	x
Anaerolineae/MAG57-VP-TO1	x	x	x	x	<i>Tepidiformia bonchosmolvsckayae</i> 3753O	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG58-VP-FC	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG102-VP-FC	x	x		x
Anaerolineae/MAG6-RN	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG2-L		x	x	x
Anaerolineae/MAG64-VP-TO1	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG26-RC1	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG67-VP-TO2	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG29-H	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG7-S	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG3-Luz	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG70-VP-TO2	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG65-VP-TO1			x	x
Anaerolineae/MAG71-VP-TO2	x	x	x	x	Thermoflexia/MAG80-M	x	x	x	x
Anaerolineae/MAG75-VP-TO2	x	x	x	x	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i> JAD2		x	x	x

En la figura 5, se observa una representación del operón dnaK con los genes seleccionados y sus respectivos dominios marcados con colores según el dominio C terminal, dominio catalítico y dominio N terminal.

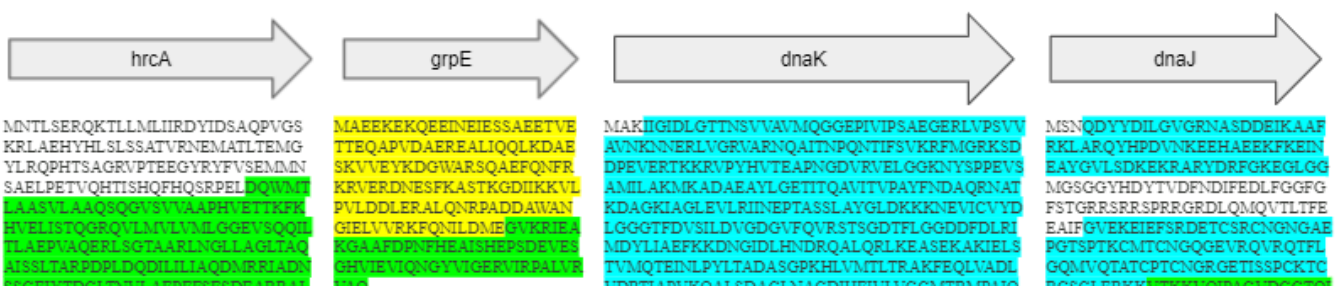


Figura 5. Representación parcial del operón *dnaK* con los genes seleccionados. El color verde hace referencia al dominio C terminal, el azul al dominio catalítico y el amarillo al dominio N terminal.

Operón *atp*

El operón *atp* está conformado por los genes *atpA*, *atpD* y *atpG*. En el cuadro 6 se observa la presencia o ausencia de los genes en los respectivos MAGs. A partir de este cuadro se puede observar como en la clase Anaerolineae los MAG109-VP-TO2, MAG31-M y MAG90-VP-TO4 no se identificó ninguno de los genes.

Cuadro 6. Presencia de los genes *atpA*, *atpD* y *atpG* en los 70 MAGs y los 6 genomas de referencia correspondientes a cada clase del filo Chloroflexi. La equis significa presencia del gen y el color rojo ausencia del mismo.

	<i>atpA</i>	<i>atpD</i>	<i>atpG</i>		<i>atpA</i>	<i>atpD</i>	<i>atpG</i>
Anaerolineae/Bin12-RC1	x	x	x	Anaerolineae/MAG8-VP-TO1	x	x	
Anaerolineae/MAG1-L	x	x	x	Anaerolineae/MAG90-VP-TO4			
Anaerolineae/MAG10-H	x	x	x	Anaerolineae/MAG92-VP-TO2	x		x
Anaerolineae/MAG109-VP-TO2				Anaerolineae/MAG95-VP-TO2	x	x	x
Anaerolineae/MAG15-Luz	x	x	x	<i>Anaerolinea thermophila</i>	x	x	x
Anaerolineae/MAG19-S	x	x	x	Caldilineae/MAG1-RC1	x	x	x
Anaerolineae/MAG2-H	x	x	x	Caldilineae/MAG13-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG2-VP-BT	x	x	x	Caldilineae/MAG4-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG21-H	x	x	x	Caldilineae/MAG5-VP-TO1	x	x	x
Anaerolineae/MAG24-Luz	x	x	x	Caldilineae/MAG66-VP-TO1	x	x	
Anaerolineae/MAG24-VP-FC	x	x	x	<i>Caldilinea aerophila</i> DSM14535	x	x	x
Anaerolineae/MAG25-VP-FC	x		x	Chloroflexia/MAG10-S	x	x	x
Anaerolineae/MAG26-VP-FC	x	x	x	Chloroflexia/MAG14-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG27-H	x			Chloroflexia/MAG15-VP-BT	x	x	x
Anaerolineae/MAG27-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG23-RC1	x		x
Anaerolineae/MAG31-M				Chloroflexia/MAG26-S	x	x	x
Anaerolineae/MAG35-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG42-VP-TO4	x	x	x

Anaerolineae/MAG36-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG55-VP-TO1	x	x	x
Anaerolineae/MAG38-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG80-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG4-H	x	x	x	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J10f	x	x	x
Anaerolineae/MAG4-VP-TO1	x	x	x	Ktedonobacteria/MAG78-H	x	x	x
Anaerolineae/MAG43-RP	x	x	x	<i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM44963	x	x	x
Anaerolineae/MAG43-VP-BT	x	x	x	Tepidiforma/MAG122-VP-TO2	x	x	x
Anaerolineae/MAG46-VP-BT	x	x	x	Tepidiformia/MAG26-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG46-VP-TO4	x	x	x	Tepidiformia/ MAG85-M	x	x	x
Anaerolineae/MAG48-VP-BT	x	x	x	Tepidiformia/Bin8-RC1	x	x	x
Anaerolineae/MAG51-VP-BT	x	x	x	Tepidiformia/MAG38-VP-TO1	x	x	x
Anaerolineae/MAG51-VP-TO1	x	x		Tepidiformia/MAG53-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG56-VP-TO1	x	x	x	Tepidiformia/MAG56-H	x	x	x
Anaerolineae/MAG57-VP-TO1	x	x	x	<i>Tepidiformia bonchosmolvskayae</i> 3753O	x	x	x
Anaerolineae/MAG58-VP-FC	x		x	Thermoflexia/MAG102-VP-FC	x	x	x
Anaerolineae/MAG6-RN	x	x	x	Thermoflexia/MAG2-L	x	x	x
Anaerolineae/MAG64-VP-TO1	x	x	x	Thermoflexia/MAG26-RC1		x	x
Anaerolineae/MAG67-VP-TO2	x	x	x	Thermoflexia/MAG29-H	x	x	x
Anaerolineae/MAG7-S	x	x	x	Thermoflexia/MAG3-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG70-VP-TO2	x	x	x	Thermoflexia/MAG65-VP-TO1	x		x
Anaerolineae/MAG71-VP-TO2	x	x	x	Thermoflexia/MAG80-M	x	x	x
Anaerolineae/MAG75-VP-TO2	x	x	x	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i> JAD2	x	x	

Los genes *atpA*, *atpG* y *atpD* pertenecen a la subunidad alfa, gamma y beta respectivamente. Estas subunidades constan de un barril beta que corresponde al dominio N - terminal, un dominio central que contiene el sitio de unión de nucleótidos y un haz alfa que corresponde al dominio C-terminal (Abrahams *et al.*, 1994).

A continuación se observa una representación parcial del operón *atp* con los genes seleccionados y sus respectivos dominios (Fig.6).



Figura 6. Representación parcial del operón *atp* con los genes seleccionados. El color verde hace referencia al dominio C terminal, el azul al dominio catalítico y el amarillo al dominio N terminal.

Operón *ruvCAB*

El operón *RuvCAB* está formado por los genes *ruvA*, *ruvB* y *ruvC*. En el cuadro 7 se observa la presencia o ausencia de los genes en los respectivos MAGs. A partir de este cuadro se observa que en la clase Anaerolineae el MAG109-VP-TO2 y en la clase Tepidiformia el MAG122-VP-TO2 no presentan ninguno de los genes.

Cuadro 7. Presencia de los genes *ruvA*, *ruvB* y *ruvC* en los 70 MAGs y los 6 genomas de referencia correspondientes a cada clase del filo Chloroflexi. La equis significa presencia del gen y el color rojo ausencia del mismo.

	<i>ruvA</i>	<i>ruvB</i>	<i>ruvC</i>		<i>ruvA</i>	<i>ruvB</i>	<i>ruvC</i>
Anaerolineae/Bin12-RC1	x	x	x	Anaerolineae/MAG8-VP-TO1			x
Anaerolineae/MAG1-L	x	x	x	Anaerolineae/MAG90-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG10-H	x	x	x	Anaerolineae/MAG92-VP-TO2	x	x	
Anaerolineae/MAG109-VP-TO2				Anaerolineae/MAG95-VP-TO2	x	x	x
Anaerolineae/MAG15-Luz	x	x	x	<i>Anaerolinea thermophila</i>	x	x	x
Anaerolineae/MAG19-S	x	x	x	Caldilineae/MAG1-RC1	x	x	x
Anaerolineae/MAG2-H	x	x	x	Caldilineae/MAG13-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG2-VP-BT	x	x	x	Caldilineae/MAG4-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG21-H	x	x	x	Caldilineae/MAG5-VP-TO1		x	
Anaerolineae/MAG24-Luz	x	x	x	Caldilineae/MAG66-VP-TO1			x
Anaerolineae/MAG24-VP-FC	x	x	x	<i>Caldilinea aerophila</i> DSM14535	x	x	x
Anaerolineae/MAG25-VP-FC	x	x	x	Chloroflexia/MAG10-S	x	x	x
Anaerolineae/MAG26-VP-FC	x	x	x	Chloroflexia/MAG14-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG27-H	x		x	Chloroflexia/MAG15-VP-BT	x	x	x
Anaerolineae/MAG27-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG23-RC1	x	x	x
Anaerolineae/MAG31-M	x	x	x	Chloroflexia/MAG26-S	x	x	x
Anaerolineae/MAG35-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG42-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG36-VP-TO4	x	x	x	Chloroflexia/MAG55-VP-TO1	x	x	x
Anaerolineae/MAG38-VP-TO4	x		x	Chloroflexia/MAG80-VP-TO4	x	x	x

Anaerolineae/MAG4-H	x	x	x	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J10f	x	x	x
Anaerolineae/MAG4-VP-TO1	x	x	x	Ktedonobacteria/MAG78-H	x		x
Anaerolineae/MAG43-RP	x	x	x	<i>Ktedonobacter racemifer</i> DSM44963	x	x	x
Anaerolineae/MAG43-VP-BT	x		x	Tepidiformia/MAG122-VP-TO2			
Anaerolineae/MAG46-VP-BT	x		x	Tepidiformia/MAG26-VP-TO4	x	x	x
Anaerolineae/MAG46-VP-TO4	x	x	x	Tepidiformia/ MAG85-M	x	x	x
Anaerolineae/MAG48-VP-BT	x	x	x	Tepidiformia/MAG8-RC1	x	x	x
Anaerolineae/MAG51-VP-BT	x	x	x	Tepidiformia/MAG38-VP-TO1	x	x	x
Anaerolineae/MAG51-VP-TO1	x	x	x	Tepidiformia/MAG53-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG56-VP-TO1	x	x	x	Tepidiformia/MAG56-H	x	x	
Anaerolineae/MAG57-VP-TO1	x	x	x	<i>Tepidiformia bonchosmolvsckayae</i> 37530	x	x	x
Anaerolineae/MAG58-VP-FC	x	x	x	Thermoflexia/MAG102-VP-FC	x	x	x
Anaerolineae/MAG6-RN	x	x	x	Thermoflexia/MAG2-L	x	x	x
Anaerolineae/MAG64-VP-TO1	x	x	x	Thermoflexia/MAG26-RC1	x	x	x
Anaerolineae/MAG67-VP-TO2	x	x	x	Thermoflexia/MAG29-H	x	x	x
Anaerolineae/MAG7-S	x	x	x	Thermoflexia/MAG3-Luz	x	x	x
Anaerolineae/MAG70-VP-TO2	x	x	x	Thermoflexia/MAG65-VP-TO1	x	x	x
Anaerolineae/MAG71-VP-TO2	x	x	x	Thermoflexia/MAG80-M	x	x	x
Anaerolineae/MAG75-VP-TO2	x	x	x	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i> JAD2	x	x	x

Como se puede observar en la siguiente representación, el complejo ruvCAB está conformado por un dominio C - terminal que se cree que es un dominio de unión a la ADN helicasa, un bucle p que corresponde al dominio N - terminal y dominios catalíticos como el dominio AAA (Dickman *et al.*, 2002).

En la figura 7 se observa una representación del operón ruvCAB con los genes seleccionados y sus respectivos dominios marcados con colores según el dominio C terminal, dominio catalítico y dominio N terminal.

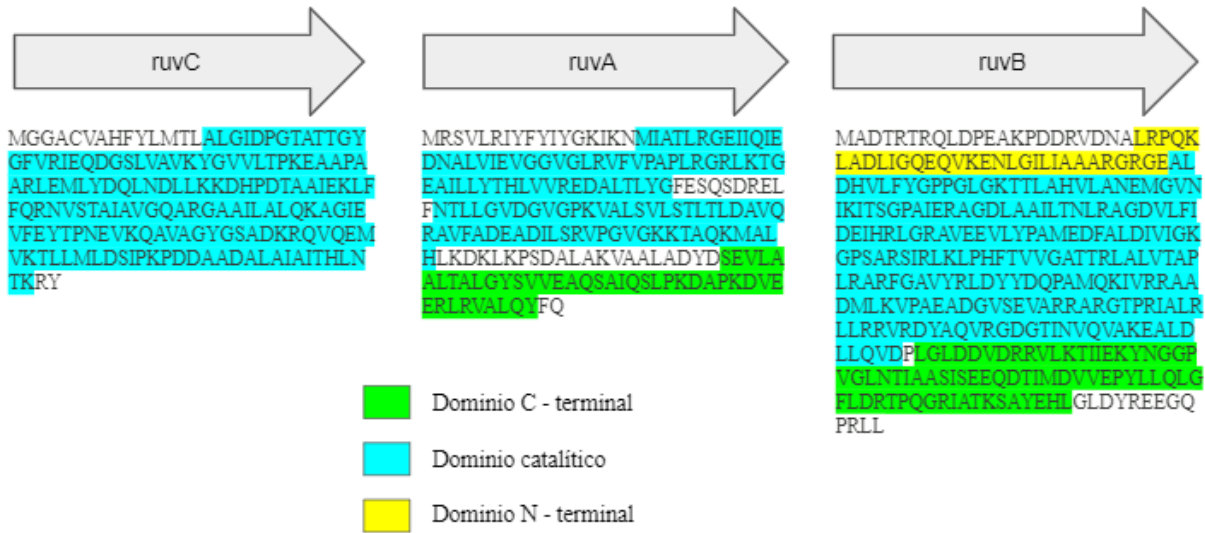


Figura 7. Representación del operón ruvCAB con los genes seleccionados. El color verde hace referencia al dominio C terminal, el azul al dominio catalítico y el amarillo al dominio N terminal.

5. Discusión

La metagenómica, a través del análisis de datos genómicos obtenidos de una muestra ambiental ha permitido el estudio de microorganismos que no son cultivables en condiciones de laboratorio (Boddu y Divakar, 2018) Esta estrategia independiente de cultivo ejerce un impacto en la comprensión de las comunidades microbianas en los ambientes extremos, como lo son las fuentes termales, además ha permitido la exploración de la diversidad microbiana y la identificación de genes (Sharma *et al.*, 2020).

En esta investigación a nivel de resolución taxonómica, las dos clases predominantes corresponden a Anaerolineae (40 MAGs) y Chloroflexi (10 MAGs). Tomando en cuenta el factor de temperatura, la mayoría de los representantes de estas clases pueden desarrollarse tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas, en rangos de temperatura entre 35 °C a 65 °C para la clase Chloroflexia y en rangos de temperatura entre 40 °C y 60 °C para la clase Anaerolineae, condiciones que permiten su amplia colonización. Por el contrario, la clase menos frecuentemente ensamblada corresponde a Ktedonobacteria. Esta clase se caracteriza por crecer

en ambientes con pH extremadamente bajo, con bajo contenido de nitrógeno, carbono y fósforo y alto contenido de metales pesados (Arif *et al.*, 2021). Dichas condiciones restringen el crecimiento en las fuentes termales en estudio. Resultados similares se han encontrado en distintas fuentes termales alrededor del mundo, como lo demuestra Amin y colaboradores (2017) en su estudio, ya que sugieren que la abundancia de Chloroflexi está directamente influenciada por la temperatura, ya que se evidenció la presencia de este filo en las fuentes termales de Murtazaabad, en Pakistán, las cuales presentaron la temperatura más alta entre los sitios en estudio (90 °C). En esta investigación se determinó que las clases más abundantes son Anaerolineae, en la que se establecieron MAGs con una identidad de 97% con genomas de las especies *Anaerolinea thermophila*, *Bellilinea caldifistulae* y *Thermanaerotherix daxensis* y la clase Chloroflexia en la que se identificaron las especies *Chloroflexus aurantiacus* y *Chloroflexus aggregans*. De manera similar, Bennet y colaboradores (2020) en su investigación, estudiaron la composición de tapetes microbianos presentes en las fuentes termales de Mushroom Springs, en el PNY, en los que se identificaron los géneros *Chloroflexus* (65 °C) y *Roseiflexus* (60 °C), y la clase Anaerolineae. También destacan la importancia de estudiar la morfología y estructura de los tapetes microbianos, ya que en este estudio observaron que en temperaturas mayores a 60 °C, dichos tapetes son delgados (~5 mm) mientras que en temperaturas inferiores (45 °C), son más gruesos y están compuestos por filamentos. Estos resultados sugieren que existen otros factores que podrían determinar el nicho del filo Chloroflexi aparte de la temperatura, como la morfología de las células, la diversidad metabólica y factores fisicoquímicos como pH y concentración de sales. Otro aspecto a considerar aparte de la temperatura es el efecto de la biogeografía, el cual se explica por medio de la teoría de islas propuesta por MacArthur y Wilson (1967). Esta teoría explica los factores que afectan la riqueza de las especies de comunidades naturales aisladas, como las fuentes termales que por sus condiciones extremas, han revelado patrones de endemismo y conducido al aislamiento geográfico y divergencia de especies (Ramette y Tiedje, 2006). Dicho lo anterior, estos factores explicarían la diversidad y el nivel de distribución de las clases del filo Chloroflexi que se identificaron en cada uno de los sitios en estudio.

Clase Anaerolineae

Las secuencias clasificadas en esta clase se encontraron entre 35 °C y 60 °C de temperatura. Como ya se mencionó anteriormente se identificaron un total de 40 MAGs pertenecientes a esta clase, de los cuales 15 tenían el gen 16S con porcentajes de identidad mayores al 95% con clonas no cultivadas. Como se puede observar en el árbol filogenómico (Fig 2), únicamente el MAG-24-Luz forma un clado con la cepa tipo *Bellinea caldifistulae* GOMI-1 (T) (AB243672). Además, los resultados del análisis del 16S para este MAG muestran un porcentaje de identidad de 99.51% con la misma secuencia. Los resultados de ANI apoyan lo observado en el análisis filogenómico, en donde se puede observar que los porcentajes de identidad son menores al 90%, lo que sugiere una baja identidad de los MAGs de estos tapetes microbianos y genomas de cepas tipo. Estos resultados sugieren que los tapetes microbianos de estas fuentes termales son una fuente de microorganismos novedosos dentro de esta clase. Como lo menciona Van Rossum en su artículo, una disminución en el ANI (< 95% de identidad) y los factores naturales tales como pH, temperatura e iones, podrían explicar la subdivisión de una especie y con esto generar nuevos microorganismos.

La mayoría de los miembros de esta clase son clasificados como mesófilos a moderadamente termófilos, siendo su temperatura óptima 50 °C, aspecto que permite su amplia colonización (Nunoura *et al.*, 2013). Numerosos reportes hacen referencia a que se han aislado de sistemas de tratamiento de aguas residuales, así como de lodos en condiciones mesofílicas y termofílicas (Matsuura *et al.*, 2015). En 2018, se reportaron los primeros genomas de Anaerolineae de ambientes sulfídicos ampliando la distribución genética y ambiental de representantes secuenciados de este clado (Ward, McGlynn y Fischer, 2018). Algunos sitios en los que representantes de esta clase se han aislado son tales como sedimentos hidrotermales de aguas profundas en el Golfo de California (Dombrowski *et al.*, 2018), sedimentos hidrotermales en el Océano Atlántico Sur (Dombrowski *et al.*, 2016), así como en lodos de reactores en Japón (Matsuura *et al.*, 2015). El rol ecológico que cumple la clase Anaerolineae no ha sido descrito detalladamente, sin embargo a partir de su metabolismo quimiotrófico, se puede decir que participan en la degradación de materia orgánica así como en ciclos biogeoquímicos en los tapetes microbianos (Thiel, Fukushima, Kanno y Hanada, 2019).

Clase Chloroflexia

En la clase Chloroflexia se ensamblaron 10 MAGs de muestras colectadas en un rango de temperatura de 40 °C a 60 °C. El único MAGs al que se le encontró el gen 16S fue el MAG-10-S, el cual es 95.28 % similar a la clona de bacteria no cultivada HWB2224-2-59 (HM243857), la cual fue identificada a partir de sedimento medio del lago Honghu en China, ciudad que registra temperatura media anual de 16,6 °C. Como se puede ver en el árbol filogenómico (Fig. 4), el MAG-80-VP-TO-4 forma un clado con la cepa tipo *Oscillochloris trichoides* DG-6, además de dos grupos monofiléticos en el que uno de estos se conformó por MAGs y secuencias de las especies *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl, *Chloroflexus aurantiacus* Y-400-fl y *Chloroflexus aurantiacus* UBA886. Lo mencionado anteriormente es apoyado por los resultados del análisis de ANI, en donde se puede observar que los porcentajes de identidad son mayores al 90 % para la mayoría de estos MAGs, lo que sugiere una alta recuperación e identidad entre los MAGs y genomas de cepas tipo. A partir de la clasificación taxonómica se logró identificar que dentro de la clase Chloroflexia, los principales representantes pertenecen a los géneros Roseiflexus y Chloroflexus.

El primer aislamiento del género *Chloroflexus* (cepa MS-G), fue a partir de un tapete microbiano en las fuentes termales de Mushroom Spring en el PNY, en donde su temperatura óptima de crecimiento fue de 60 °C (Thiel *et al.*, 2014). Sin embargo, se han encontrado representantes de este género capaces de vivir tanto en temperaturas desde los 52 °C hasta 60 °C como en fuentes termales con pH neutro hasta ácido (Pierson y Castenholz, 1974). En este estudio los MAGs asociados al género Chloroflexus, fueron extraídos de muestras colectadas con temperatura de 60 °C, coincidiendo así con lo reportado en la literatura.

En cuanto a *Roseiflexus*, según fuentes bibliográficas, el primer aislamiento se realizó a partir de un tapete microbiano en una fuente termal en Japón, y se determinó que su temperatura óptima de crecimiento fue de 50 °C (Hanada, Takaichi, Matsuura y Nakamura, 2002), mientras que en este estudio se reportaron MAGs con similitud a este género en muestras con temperaturas entre los 50 °C y 60 °C. Por último, el MAG-15-VP-BT se identificó en muestras con una temperatura de 40 °C, siendo esta inferior a lo anteriormente mencionado, sin embargo, las especies de esta clase pueden desarrollarse tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas, en rangos de temperatura entre 35 °C a 65 °C.

La clase Chloroflexia se encuentra en las capas inferiores de los tapetes microbianos en donde usualmente utilizan los productos orgánicos producidos por las cianobacterias en las capas superiores, las cuales son los productores primarios en estos tapetes (Van der *et al.*, 2003). Sin embargo, los representantes de esta clase también pueden crecer independientes en fuentes termales con altos niveles de sulfuro, ya que utilizan este compuesto como donante de electrones (Sprague *et al.*, 1981).

Clase Thermoflexia

Las secuencias relacionadas con esta clase se encontraron en muestras con temperaturas entre 40 °C y 75 °C de temperatura. Se ensamblaron un total de 9 MAGs clasificados como Thermoflexia, de los cuales 2 tenían el gen 16S con porcentajes de identidad mayores al 94 % con clonas de bacterias no cultivadas y uno con 98.93% de identidad con la cepa *Thermoflexus hugenholtzii* JAD2 (KC526151). La clona SM1F10 (AF445692) fue aislada de las fuentes termales Mammoth en el PNY, por su parte la clona MH938164, fue identificada en las fuentes termales de Porcelana en el norte de la Patagonia chilena. Como se puede ver en el árbol filogenómico (Fig. 4), solamente el MAG-2-L forma un clado con la cepa tipo *Thermoflexus hugenholtzii* JAD2 aislada de sedimento Great Boiling Spring, Nevada, Estados Unidos (Dodsworth *et al.*, 2014). Dicho resultado es corroborado por el árbol filogenético (Fig. 3) en el que se observa la formación de dicho clado con un porcentaje de identidad de 98.93 % con la cepa tipo anteriormente mencionada. Los demás MAGs no se encuentran asociados a ninguno de los genomas de las cepas tipo de esta clase. Por su parte, en los resultados de ANI se observa que el MAG-2-L posee un porcentaje de identidad de 98.24% con respecto a la cepa tipo anteriormente mencionada, mientras que los demás MAGs poseen porcentajes de identidad inferiores al 90%, apoyando así los resultados observados en el árbol filogenómico. Estos bajos porcentajes reflejan el potencial de las fuentes termales como fuentes de microorganismos novedosos.

Según lo expuesto por Dodsworth y colaboradores (2014), *Thermoflexus hugenholtzii* JAD2 tiene la temperatura de crecimiento óptima más alta (75 °C), esto explicaría la presencia de esta cepa en Las Lilas, ya que en dicho sitio se registró la temperatura más alta (74.0 °C), mientras que en los demás sitios la temperatura registrada fue inferior, por lo que las condiciones de temperatura no son propicias para el crecimiento de esta cepa. Sin embargo, en este estudio, se

encontraron MAGs en muestras con temperaturas entre los 40 °C y 75 °C, por lo que se podría con estudios más exhaustivos y más evidencias, ampliar el rango de temperatura para esta clase.

La clase Thermoflexia resulta ser abundante en fuentes termales con temperaturas elevadas (60 °C -75 °C). Sin embargo, la información que existe con respecto a sus capacidades metabólicas es limitada debido a los bajos rendimientos de crecimiento. Los representantes de esta clase en los tapetes microbianos aprovechan el material detrítico, ya que con este material rico en proteínas exógenas, vitaminas y compuestos orgánicos suplen las necesidades metabólicas y con esto alcanzan un óptimo crecimiento. Estos microorganismos liberan aminoácidos, timina y ácido nicotínico, los cuales serán aprovechados por los demás microorganismos en el sitio (Thomas *et al.*, 2021).

Clase Tepidiformia

En esta clase se ensamblaron 7 MAGs provenientes de muestras en un rango de temperatura desde los 35 °C hasta los 60 °C, de los cuales 5 tenían el gen 16S. Estos MAGs presentaron porcentajes de identidad mayores al 95% con la cepa tipo *Tepidiforma bonchosmolovskayae* (MN264258). Sin embargo, como se pudo observar en el árbol filogenómico (Fig. 3), solamente el MAG-56-H forma un clado con la cepa tipo anteriormente mencionada. Estos resultados son apoyados por el ANI, en el que se obtuvo un porcentaje de identidad de 98.64 %, mientras que para los MAGs restantes se obtuvieron porcentajes menores al 90 %, justificando así la razón por la cual los estos MAGs no se encuentran asociados a ninguno de los genomas de las cepas tipo de esta clase. Esta especie es una bacteria aerobia termófila aislada en un tapete microbiano en las fuentes termales de Chukotka, Rusia. Su temperatura de crecimiento va desde 42 °C a 60 °C (Kochetkova *et al.*, 2020), condiciones que coinciden con las muestras en este estudio, lo que podría favorecer la presencia de estos microorganismos en los sitios anteriormente mencionados.

Clase Caldilineae

Las secuencias relacionadas con esta clase se encontraron en muestras con temperaturas entre 50 °C y 60 °C de temperatura. Esta clase, según lo reportado en la literatura, tiene una temperatura de crecimiento óptima de 55 °C, sin embargo, se ha visto crecimiento en temperaturas desde los 37 °C hasta los 65 °C (Sekiguchi *et al.*, 2003). En este estudio se registró

temperaturas desde los 50 °C a 60 °C, por lo que dichas temperaturas se encuentran en el rango propuesto en el 2003. Se identificaron 5 MAGs dentro de esta clase, de los cuales 2 poseen el gen 16S. El MAG-4-VP-TO4 presentó un porcentaje de identidad menor al 95% con la clona (P3-b19) aislada en un campo hidrotermal en Juan de Fuca (Li *et al.*, 2014), mientras que el MAG-1-RC1 presentó un porcentaje mayor al 98% con la clona (Tat-08-003_12_54) aislada del campo de géiseres El Tatio, en el norte de Chile (Engel *et al.*, 2013). A partir del árbol filogenómico se puede determinar que ninguno de los MAGs se encuentra asociado a genomas de cepas tipo dentro de esta clase. Mediante el ANI se corroboró los resultados del árbol filogenómico, ya que se obtuvieron porcentajes menores al 90%. Estos resultados sugieren que estos sitios podrían ser fuente potencial de nuevas especies dentro del filo Chloroflexi.

La clase Caldilineae al igual que las demás clases del filo Chloroflexi, se encuentran en la zona anóxica de los tapetes microbianos y gracias a su metabolismo fermentativo cumplen la función de degradar exopolímeros en estos sitios, los cuales liberan calcio que contribuyen a la formación de microbialitas (Schneider *et al.*, 2013).

Clase Ktedonobacteria

Para finalizar, se obtuvo un único MAGs (MAG78-H) clasificado como clase Ktedonobacteria en una muestra con temperatura de 50 °C. En el árbol filogenómico se observa como el MAG-78-H no se asocia con la cepa tipo de esta clase. A su vez, los resultados del ANI corroboran el resultado del árbol filogenómico ya que presentó un porcentaje de identidad de 65.35 % con respecto a la especie tipo *Ktedonobacteria racemifer* DSM44963, lo que sugiere una baja identidad entre el MAGs de este tapete microbiano y el genoma de la cepa tipo.

Los representantes de esta clase son considerados como mesófilos y termófilos ya que se han reportado temperaturas entre los 17 °C y 40 °C. (Arif *et al.*, 2021). Sin embargo, en 2010, Shuhei y colaboradores, describen la especie *Thermosporothrix hazakensis*, clasificada dentro de esta clase, la cual fue identificada en muestras de compost en Japón. Esta especie crece en rangos de temperatura entre los 31 °C y 58 °C, por lo que este reporte y otros factores ambientales, podría justificar la presencia del MAG-78-H en el sitio Hornillas (CIBCM-H), en el que la temperatura es de 50 °C.

Los miembros de la clase Ktedonobacteria, son enriquecidos en ambientes extremos con valores de pH ácidos, bajos niveles de hidrógeno, carbono y fósforo así como elevadas cantidades de metales pesados (Arif *et al.*, 2021). Como lo explican Arif y colaboradores en su artículo, en el que estudiaron un tapete microbiano en el volcán Sapichu, México, observaron que el perfil metabólico de esta clase se relaciona con la metanogénesis, la respiración de azufre, la fijación de nitrógeno y transporte de metales pesados.

Termotolerancia

Los genes involucrados en la supervivencia a altas temperaturas se caracterizan por cumplir funciones de estabilización de membrana o funciones metabólicas, ya que se ha visto que algunas proteínas de choque térmico se encargan de mantener la fluidez de la membrana así como otros genes relacionados con la termotolerancia que cumplen funciones de mantenimiento en microorganismos (Charoensuk *et al.*, 2017). Los genes responsables del metabolismo energético se encargan de la síntesis de ATP, lo cual es necesario para la reparación de macromoléculas, ADN o ARN dañados por las elevadas temperaturas. También se identificaron genes que participan en la estabilización de la membrana externa y modificación del ARNt, también genes encargados del control de la traducción y la división celular, los cuales pueden evitar errores en dichos procesos en altas temperaturas (Murata *et al.*, 2018)

Operón dnaK

Los genes *hrcA*, *grpE*, *dnaK* y *dnaJ*, que se encuentran dentro del operón dnaK, se clasifican dentro del grupo de las chaperonas (Murata *et al.*, 2018). El gen *hrcA* actúa como regulador negativo de genes de choque térmico evitando la inducción de los operones *grpE*, *dnaK* y *dnaJ*. Por su parte los genes *grpE* y *dnaK* participan activamente en la respuesta al choque térmico al prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas por estrés, de manera similar el gen *dnaJ*, que en condiciones fisiológicas, está involucrado en el plegamiento de proteínas y, bajo estrés, evita la agregación de proteínas e incluso pueden replegar proteínas agregadas.

Operón atp

Los genes *atpA*, *atpD* y *atpG* se clasifican en la categoría de metabolismo energético ya que participan en la síntesis en la cadena respiratoria y en el complejo de la ATP sintasa de tipo F1F0 (Murata *et al.*, 2018). Las ATPasas tipo F1F0 se encuentran en cloroplastos, mitocondrias y

membranas plasmáticas y se consideran como los principales productores de ATP a partir del gradiente de protones generado por la fosforilación oxidativa o fotosíntesis (Cross y Müller, 2004). Estos genes (*atpA*, *atpG* y *atpD*) contribuyen a dicha síntesis, que puede ser necesaria para reparar daños de macromoléculas, proteínas, ADN o ARN dadas las elevadas temperaturas (Murata *et al.*, 2018).

Operón *ruvCAB*

El operón RuvCAB está formado por los genes *ruvA*, *ruvB* y *ruvC*, los cuales se encargan de la resolución de las uniones de Holliday y la reparación del ADN (Dickman *et al.*, 2002). El complejo RuvA-RuvB en presencia de ATP renaturaliza la estructura cruciforme del ADN (Mandal *et al.*, 1993), mientras que el gen *ruvC* se encarga de producir proteínas conservadas necesarias para el crecimiento celular y en cuanto a reparación del ADN, corta la estructura del ADN superenrollado (Iwasaki *et al.*, 1991).

De los genes asociados a los distintos operones se identificaron 10 potencialmente asociados con la termotolerancia, los cuales están presentes en la mayoría de MAGs, lo que sugiere que dichos genes se encuentran altamente conservados. Sin embargo en los MAG109-VP-TO2, MAG31-M, MAG90-VP-TO4 no se identificó el operón *atp* mientras que en el MAG122-VP-TO2, no se identificó el operón *ruvCAB*. A partir de la metodología empleada en esta investigación, no se puede afirmar que dichos genes no están presentes en los MAGs anteriormente citados, ya que el porcentaje de completitud (> 60%) de dichos MAGs (72,53%, 98,54%, 98,18% y 60,07% respectivamente) se considera de calidad media-alta, por lo que se debe tomar en cuenta otros factores. Por ejemplo, se ha demostrado que en el proceso de ensamblaje, únicamente entre el 24,2% y 36,4% de las lecturas se logran ensamblar de manera adecuada, mientras que en el agrupamiento o *binning* de metagenomas aproximadamente el 23% de los genomas se agrupan con éxito, demostrando así que en ambos procesos ocurre la pérdida de información (Maguire *et al.*, 2020). Otro aspecto a considerar son las variantes alélicas, ejemplo de estas variantes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés), las inserciones y las deleciones (Collery *et al.*, 2017). Estas variantes podrían alterar la función normal de un gen, siendo esta una de las principales causas de las diferencias en la expresión de genes (Liu *et al.*, 2020) por lo que explican la heterogeneidad entre genomas que están estrechamente relacionados (Okazaki *et al.*, 2022). Por último, es importante mencionar que no siempre la diversidad

genética va a depender de parámetros físico-químicos sino que también se debe considerar el aislamiento geográfico entre las fuentes termales (Yim *et al.*, 2006). Estos datos explicarían la posible ausencia de los genes en los MAGs en estudio.

6. Conclusiones

Se identificaron 74 MAGs en seis clases del filo Chloroflexi en los tapetes microbianos de fuentes termales de Costa Rica, contribuyendo al conocimiento de este filo en cuanto diversidad y nivel de distribución, siendo este el primer estudio con dicho enfoque a partir de datos de metagenómica *shotgun* en nuestro país. Los MAGs en estudio se encontraron en muestras con un rango de temperatura de 35 °C a 74 °C, siendo VP-TO1-Tucano 1 (56 °C) el sitio con mayor cantidad de MAGs identificados (12). Pese a la poca información relacionada a MAGs y genomas de referencia en el filo Chloroflexi, según el análisis filogenómico y la comparación de nucleótidos, del total, únicamente se identificaron 2 MAGs con porcentaje de identidad entre 90% y 95% y 4 MAGs entre 95% y 98%, sin embargo se encontraron diversos MAGs con baja identidad (< 90% en análisis genómicos y basados en el gen 16S ARNr) y clasificación en clados no asociados a genomas de cepas tipo y otras secuencias de referencia, lo que sugiere que los tapetes microbianos de las fuentes termales costarricenses son una fuente de microorganismos novedosos para este filo. Los genes seleccionados, a pesar de cumplir funciones de mantenimiento en microorganismos también son esenciales para la supervivencia en altas temperaturas. No se tienen cultivos puros para realizar experimentos en el laboratorio que incluyan los MAGs en estudio, en donde se demuestre que los genes identificados participan en la termotolerancia. Pese a eso, según la metodología utilizada, se identificaron 10 genes que podrían estar relacionados con la termotolerancia, ya que participan activamente en la respuesta al choque térmico mediante la prevención de la agregación de proteínas desnaturalizadas por estrés, reparación daños de macromoléculas, proteínas, ADN o ARN dadas las elevadas temperaturas, mediante la síntesis de ATP y producción de proteínas para el crecimiento celular. Estos genes están presentes en la mayoría de los MAGs, lo que sugiere que están conservados en las diferentes clases del filo Chloroflexi.

7. Recomendaciones

1. Realizar un análisis estadístico con el fin de observar la correlación que existe entre MAGs de muestras de distintas temperaturas, así como un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la asociación taxonómica y funcional entre dichas muestras.
2. Estudiar otros factores que podrían determinar el nicho del filo Chloroflexi como la morfología de las células, la diversidad metabólica y factores fisicoquímicos como pH y concentración de sales.
3. Realizar trabajo de laboratorio, primero con el cultivo basándose en la identificación de las especies encontradas para posteriormente realizar ensayos tales como exposición a diferentes temperaturas o *knockout* de genes con el fin de evaluar experimentalmente el comportamiento que desarrollan los genes relacionados con la termotolerancia identificados en los MAGs en estudio, ante la exposición a temperaturas elevadas.
4. Emplear alguna estrategia tipo ómica, como la metabolómica, para evaluar los perfiles de metabolitos intracelulares en respuesta al estrés por incremento de la temperatura y de otras variables fisicoquímicas. Estos datos contribuirán a ampliar y complementar los resultados obtenidos.

8. Referencias bibliográficas

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., & Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370(6491), 621-628. doi:10.1038/370621a0.
- Alcamán-Arias, M. E., Pedrós-Alió, C., Tamames, J., Fernández, C., Pérez-Pantoja, D., Vásquez, M., & Díez, B. (2018). Diurnal Changes in Active Carbon and Nitrogen Pathways Along the Temperature Gradient in Porcelana Hot Spring Microbial Mat. *Frontiers in microbiology*, 9, 2353. doi:10.3389/fmicb.2018.02353.
- Almeida, O. G. G., & De Martinis, E. C. P. (2018). Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-018-9464-9.

- Alvarado, G. E. y Vargas, A. G. (2017). Historia del descubrimiento y aprovechamiento de las fuentes termales en Costa Rica. *Revista Geológica de América Central*, (57), 55-84. doi: 10.15517/rgac.v0i57.30148.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 59(1), 143-169.
- Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., El Ouahab Bentabet, A., & López-García, P. (2014). Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles*, 18(6), 1035–1047. doi:10.1007/s00792-014-0680-7.
- Amin, A., Ahmed, I., Salam, N., Kim, B.-Y., Singh, D., Zhi, X.-Y., ... Li, W.-J. (2017). Diversity and Distribution of Thermophilic Bacteria in Hot Springs of Pakistan. *Microbial Ecology*, 74(1), 116–127. doi:10.1007/s00248-017-0930-1
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [En línea]. Disponible en línea: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., ... & Zdobnov, E. M. (2000). InterPro—an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Bioinformatics*, 16(12), 1145-1150.
- Arif, S., Willenberg, C., Dreyer, A., Nacke, H., & Hoppert, M. (2021). Sasso Pisano Geothermal Field Environment Harbours Diverse Ktedonobacteria Representatives and Illustrates Habitat-Specific Adaptations. *Microorganisms*, 9(7), 1402. doi:10.3390/microorganisms9071402.
- Athanasopoulou, K., Boti, M. A., Adamopoulos, P. G., Skourou, P. C., & Scorilas, A. (2022). Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life*, 12(1), 30.
- Bankier, A. T. (2001). Shotgun DNA Sequencing. *DNA Sequencing Protocols*, 089–100. doi:10.1385/1-59259-113-2:089
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., & Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences*, 91(5), 1609-1613.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1609>.
- Bauld, J., & Brock, T. D. (1973). Ecological studies of Chloroflexis, a gliding photosynthetic bacterium. *Archiv für Mikrobiologie*, 92(4), 267-284. doi: 10.1007/bf00409281.
- Bennett, A. C., Murugapiran, S. K., & Hamilton, T. L. (2020). Temperature impacts community structure and function of phototrophic Chloroflexi and Cyanobacteria in two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. *Environmental microbiology reports*, 12(5), 503-513. doi: 10.1111/1758-2229.12863
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P. L., Rumble, D. I. I. I., Stein, H. J., Hannah, J. L., ... & Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427(6970), 117-120. doi:10.1038/nature02260 .
- Bernfur, K., Rutsdottir, G., & Emanuelsson, C. (2017). The chloroplast-localized small heat shock protein Hsp21 associates with the thylakoid membranes in heat-stressed plants. *Protein Science*, 26(9), 1773-1784. doi:10.1002/pro.3213.
- Bharti, R., & Grimm, D. G. (2021). Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in bioinformatics*, 22(1), 178-193. doi:10.1093/bib/bbz155.
- Blondin, P. A., Kirby, R. J., & Barnum, S. R. (1993). The heat shock response and acquired thermotolerance in three strains of cyanobacteria. *Current Microbiology*, 26(2), 79-84. doi:10.1007/bf01577340.
- Brenes-Guillén, L., Vidaurre-Barahona, D., Morales, S., Mora-López, M., Sittenfeld, A., & Uribe-Lorío, L. (2021). Novel Cyanobacterial Diversity Found in Costa Rican Thermal Springs Associated with Rincon de la Vieja and Miravalles Volcanoes: A Polyphasic Approach. *Journal of Phycology*, 57(1), 183-198. doi: 10.1111/jpy.1307.
- Brininger, C., Spradlin, S., Cobani, L., & Evilia, C. (2018, December). The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 84, pp. 158-169). Academic Press. doi: 10.1016/j.semcd.2017.12.016.

- Boddu, R. S., & Divakar, K. (2018). Metagenomic insights into environmental microbiome and their application in food/pharmaceutical industry. In *Microbial Biotechnology* (pp. 23-38). *Springer*, Singapore. doi:10.1007/978-981-10-7140-9_2
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, *btu170*.
- Bowers, R. M., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Harmon-Smith, M., Doud, D., Reddy, T. B. K., ... & Woyke, T. (2017). Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature biotechnology*, *35*(8), 725-731. doi: 10.1038/nbt.3893.
- Brock, T. D., & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology*, *98*(1), 289-297.
- Caldwell, S. L., Liu, Y., Ferrera, I., Beveridge, T., & Reysenbach, A. L. (2010). *Thermocrinis minervae* sp. nov., a hydrogen and sulfur-oxidizing, thermophilic member of the Aquificales from a Costa Rican terrestrial hot spring. *Microbiology society*. doi: 10.1099/ijjs.0.010496-0.
- Callieri, C. (2017). *Synechococcus* plasticity under environmental changes. *FEMS Microbiology Letters*, *364*(23), fnx229. doi: 10.1093/femsle/fnx229.
- Červený, J., Sinetova, M. A., Zavřel, T., & Los, D. A. (2015). Mechanisms of High Temperature Resistance of *Synechocystis* sp. PCC 6803: An Impact of Histidine Kinase 34. *Life (Basel, Switzerland)*, *5*(1), 676–699. <https://doi.org/10.3390/life5010676>.
- Chang, Y. J., Land, M., Hauser, L., Chertkov, O., Del Rio, T. G., Nolan, M., ... & Lapidus, A. (2011). Non-contiguous finished genome sequence and contextual data of the filamentous soil bacterium *Ktedonobacter racemifer* type strain (SOSP1-21 T). *Standards in genomic sciences*, *5*(1), 97-111. doi: 10.4056/sigs.2114901.
- Charoensuk, K., Sakurada, T., Tokiyama, A., Murata, M., Kosaka, T., Thanonkeo, P., & Yamada, M. (2017). Thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in thermotolerant ethanologenic *Zymomonas mobilis* TISTR 548. *Biotechnology for biofuels*, *10*(1), 1-11. doi:10.1186/s13068-017-0891-0.

- Chatterjee, A., Rajarshi, K., Ghosh, H., Singh, M. K., Roy, O. P., & Ray, S. (2020). Molecular chaperones in protein folding and stress management in cyanobacteria. In *Advances in Cyanobacterial Biology* (pp. 119-128). *Academic Press*. doi: 10.1016/B978-0-12-819311-2.00008-5.
- Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. 2019. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics*, btz848.
- Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for Whole-Genome Shotgun Sequencing of Microbial Communities. *PLoS Computational Biology*, 1(2), e24. doi:10.1371/journal.pcbi.0010024.
- Chen, L.-X., Anantharaman, K., Shaiber, A., Eren, A. M., & Banfield, J. F. (2020). Accurate and complete genomes from metagenomes. *Genome Research*. doi:10.1101/gr.258640.119.
- Chiriac, C. M., Szekeres, E., Rudi, K., Baricz, A., Hegedus, A., Dragoş, N., & Coman, C. (2017). Differences in temperature and water chemistry shape distinct diversity patterns in thermophilic microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 83(21), e01363-17. doi:10.1128/AEM.01363-17.
- Choure, K., Parsai, S., Kotoky, R., Srivastava, A., Tilwari, A., Rai, P. K., ... & Pandey, P. (2021). Comparative metagenomic analysis of two alkaline hot springs of Madhya Pradesh, India and Deciphering the extremophiles for industrial enzymes. *Frontiers in Genetics*, 12. doi: 10.3389/fgene.2021.643423
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Genomics & Systems Biology. *Molecular Biology*, 248–272. doi:10.1016/b978-0-12-378594-7.00009-3.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67–D72. doi: 10.1093/nar/gkv1276.
- Collery, M. M., Kuehne, S. A., McBride, S. M., Kelly, M. L., Monot, M., Cockayne, A., ... & Minton, N. P. (2017). What's a SNP between friends: The influence of single nucleotide polymorphisms on virulence and phenotypes of *Clostridium difficile* strain 630 and derivatives. *Virulence*, 8(6), 767-781. doi: 10.1080/21505594.2016.1237333.

- Colman, D. R., Jay, Z. J., Inskeep, W. P., Jennings, R. D., Maas, K. R., Rusch, D. B., & Takacs-Vesbach, C. D. (2016). Novel, deep-branching heterotrophic bacterial populations recovered from thermal spring metagenomes. *Frontiers in microbiology*, 7, 304. doi:10.3389/fmicb.2016.00304.
- Cross, R. L., & Müller, V. (2004). The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS letters*, 576(1-2), 1-4. doi:/10.1016/j.febslet.2004.08.065.
- Colman, D. R., Jay, Z. J., Inskeep, W. P., Jennings, R. D., Maas, K. R., Rusch, D. B., & Takacs-Vesbach, C. D. (2016). Novel, deep-branching heterotrophic bacterial populations recovered from thermal spring metagenomes. *Frontiers in microbiology*, 7, 304. doi: 10.3389/fmicb.2016.00304.
- Costello, E. K., & Schmidt, S. K. (2006). Microbial diversity in alpine tundra wet meadow soil: novel Chloroflexi from a cold, water-saturated environment. *Environmental microbiology*, 8(8), 1471-1486.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., & López-García, P. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PloS one*, 6(12), e28767. doi:10.1371/journal.pone.0028767.
- Cuecas, A. (2017). Vida microbiana a temperaturas elevadas. Diversidad, aislamiento, termoestabilidad molecular y genómica. *Universidad de Sevilla: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla*, 1-285.
- Darling, A. E., Jospin, G., Lowe, E., Matsen IV, F. A., Bik, H. M., & Eisen, J. A. (2014). PhyloSift: phylogenetic analysis of genomes and metagenomes. *Peer J*, 2, e243. doi: 10.7717/peerj.243.
- DeCastro, M. E., Rodríguez-Belmonte, E., & González-Siso, M. I. (2016). Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes. *Frontiers in microbiology*, 7, 1521. doi:10.3389/fmicb.2016.01521.

- Dickman, M. J., Ingleston, S. M., Sedelnikova, S. E., Rafferty, J. B., Lloyd, R. G., Grasby, J. A., & Hornby, D. P. (2002). The RuvABC resolvasome: quantitative analysis of RuvA and RuvC assembly on junction DNA. *European journal of biochemistry*, 269(22), 5492-5501. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03250.x.
- Dodds, W. K., & Whiles, M. R. (2010). Unusual or Extreme Habitats. *Freshwater Ecology*, 375–398. doi:10.1016/b978-0-12-374724-2.00015-5.
- Dodsworth, J. A., Gevorkian, J., Despujos, F., Cole, J. K., Murugapiran, S. K., Ming, H., ... & Hedlund, B. P. (2014). *Thermoflexus hugenholtzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, filamentous bacterium representing a novel class in the Chloroflexi, Thermoflexia classis nov., and description of Thermoflexaceae fam. nov. and Thermoflexales ord. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(6), 2119-2127. doi: 10.1099/ijs.0.055855-0.
- Dombrowski, N., Teske, A. P., & Baker, B. J. (2018). Expansive microbial metabolic versatility and biodiversity in dynamic Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Nature communications*, 9(1), 1-13. doi: 10.1038/s41467-018-07418-0.
- Doolittle, W. F., & Zhaxybayeva, O. (2010). Metagenomics and the units of biological organization. *Bioscience*, 60(2), 102-112. doi: 10.1525/bio.2010.60.2.5.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology*, 16(1). doi:10.1186/s13059-015-0721-2.
- Engel, A. S., Johnson, L. R., & Porter, M. L. (2013). Arsenite oxidase gene diversity among Chloroflexi and Proteobacteria from El Tatio Geysir Field, Chile. *FEMS microbiology ecology*, 83(3), 745-756.
- Eren, A. M., Esen, Ö. C., Quince, C., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Delmont, T. O. (2015). Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for omics data. *PeerJ*, 3, e1319. doi:10.7717/peerj.1319.

- Eriksson, M. J., & Clarke, A. K. (1996). The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, *178*(16), 4839–4846. doi:10.1128/jb.178.16.4839-4846.1996.
- Ferris, M. J., Ruff-Roberts, A. L., Kopczynski, E. D., Bateson, M. M., & Ward, D. M. (1996). Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Appl. Environ. Microbiol.*, *62*(3), 1045-1050.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., ... Hess, W. R. (2008). Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Environmental Microbiology*, *10*(2), 460–473. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01467.
- Fouke, B. W., Farmer, J. D., Des Marais, D. J., Pratt, L., Sturchio, N. C., Burns, P. C., & Discipulo, M. K. (2000). Depositional facies and aqueous-solid geochemistry of travertine-depositing hot springs (Angel Terrace, Mammoth Hot Springs, Yellowstone National Park, USA). *Journal of Sedimentary Research*, *70*(3), 565-585. doi 10.1306/2dc40929-0e47-11d7-8643000102c1865d.
- Gaisin, V. A., Kalashnikov, A. M., Grouzdev, D. S., Sukhacheva, M. V., Kuznetsov, B. B., & Gorlenko, V. M. (2017). *Chloroflexus islandicus* sp. nov., a thermophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium from a geyser. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(5), 1381-1386. doi: 10.1099/ijsem.0.001820.
- Garcia Costas, A. M., Liu, Z., Tomsho, L. P., Schuster, S. C., Ward, D. M., & Bryant, D. A. (2011). Complete genome of *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, a chlorophyll-based photoheterotroph belonging to the phylum Acidobacteria. *Environmental Microbiology*, *14*(1), 177–190. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02592.x.
- Gawad, C., Koh, W., & Quake, S. R. (2016). Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature Reviews Genetics*, *17*(3), 175-188. doi: 10.1038/nrg.2015.16.
- Ghurye, J. S., Cepeda-Espinoza, V., & Pop, M. (2016). Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *89*(3), 353–362.

- Gorlenko, V. M., Bryantseva, I. A., Kalashnikov, A. M., Gaisin, V. A., Sukhacheva, M. V., Gruzdev, D. S., & Kuznetsov, B. B. (2014). *Candidatus 'Chloroploca asiatica'* gen. nov., sp. nov., a new mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic bacterium. *Microbiology*, 83(6), 838-848. doi:10.1134/s0026261714060083.
- Hanada, S. (2003). Filamentous anoxygenic phototrophs in hot springs. *Microbes and environments*, 18(2), 51-61. doi: 10.1264/jsme2.18.51/
- Hanada, S. (2014). The Phylum Chloroflexi, the Family Chloroflexaceae, and the Related Phototrophic Families Oscillochloridaceae and Roseiflexaceae. *The Prokaryotes*, 515–532. doi:10.1007/978-3-642-38954-2_165.
- Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K., & Matsuura, K. (1995). *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 676-681. doi:10.1099/00207713-45-4-676.
- Hanada, S., Takaichi, S., Matsuura, K., & Nakamura, K. (2002). *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium that lacks chlorosomes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), 187-193. doi:10.1099/00207713-52-1-187.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249. doi:10.1016/s1074-5521(98)90108-9.
- Hemp, J., Ward, L. M., Pace, L. A., & Fischer, W. W. (2015). Draft genome sequence of *Ornatilinea apprima* P3M-1, an anaerobic member of the Chloroflexi class Anaerolineae. *Genome announcements*, 3(6), e01353-15. doi:10.1128/genomeA.01353-15.
- Hemp, J., Ward, L. M., Pace, L. A., & Fischer, W. W. (2015). Draft genome sequence of *Levilinea saccharolytica* KIBI-1, a member of the Chloroflexi class Anaerolineae. *Genome announcements*, 3(6), e01357-15. doi:10.1128/genomeA.01357-15.

- Hernández Ascencio, W. I. (2012). *Caracterización de dos comunidades microbianas de ambientes extremos ácidos del Parque Nacional Volcán Rincón de la Vieja, Guanacaste, Costa Rica*. [Tesis doctoral, Universidad de Costa Rica].
- Hynek, B. M., Rogers, K. L., Antunovich, M., Avard, G., & Alvarado, G. E. (2018). Lack of Microbial Diversity in an Extreme Mars Analog Setting: Poás Volcano, Costa Rica. *Astrobiology*, 18(7), 923–933. doi:10.1089/ast.2017.1719.
- Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Hufnagel, D. E., Hufford, M. B., & Seetharam, A. S. (2020). SequelTools: a suite of tools for working with PacBio Sequel raw sequence data. *BMC bioinformatics*, 21(1), 1-11. doi:10.1186/s12859-020-03751-8.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4765-4774. doi: 10.1128/JB.180.18.4765-4774.1998.
- Jardine, J. L., & Ubomba-Jaswa, E. (2020). Combination of genetic tools to discern *Bacillus* species isolated from hot springs in South Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 14(8), 447-464. doi:10.5897/AJMR2019.9066
- Iwasaki, H., Takahagi, M., Shiba, T., Nakata, A., & Shinagawa, H. (1991). Escherichia coli RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *The EMBO journal*, 10(13), 4381-4389.
- Johnson, L. R. (2009). Environmental influences on the mobility and speciation of arsenic in the geothermal waters of El Tatio Geyser Field, Chile.
- Kale, V., Björnsdóttir, S. H., Friðjónsson, Ó. H., Pétursdóttir, S. K., Omarsdóttir, S., & Hreggviðsson, G. Ó. (2013). *Litorilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., an aerobic member of the class Caldilineae, phylum Chloroflexi, isolated from an intertidal hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(3), 1149-1154. doi: 10.1099/ij.s.0.044115-0.

- Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K., & Eurwilaichitr, L. (2004). Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44(6), 430-444. doi: 10.1002/jobm.200410388.
- Key, T. A., Richmond, D. P., Bowman, K. S., Cho, Y.-J., Chun, J., da Costa, M. S., ... Moe, W. M. (2016). Genome sequence of the organohalide-respiring *Dehalogenimonas alkenigignens* type strain (IP3-3T). *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 32-40. doi:10.1186/s40793-016-0165-7.
- Key, T. A., Bowman, K. S., Lee, I., Chun, J., Albuquerque, L., da Costa, M. S., ... & Moe, W. M. (2017). *Dehalogenimonas formicexedens* sp. nov., a chlorinated alkane-respiring bacterium isolated from contaminated groundwater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), 1366-1373. doi:10.1099/ijsem.0.001819.
- Kim, K. M., Nasir, A., Hwang, K., & Caetano-Anollés, G. (2014). A Tree of Cellular Life Inferred from a Genomic Census of Molecular Functions. *Journal of Molecular Evolution*, 79(5-6), 240–262. doi:10.1007/s00239-014-9637-9.
- Kimura, A., Eaton-Rye, J. J., Morita, E. H., Nishiyama, Y., & Hayashi, H. (2002). Protection of the oxygen-evolving machinery by the extrinsic proteins of photosystem II is essential for development of cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and cell physiology*, 43(8), 932-938. doi: doi.10.1093/pcp/pcf110.
- Kochetkova, T. V., Zayulina, K. S., Zhigarkov, V. S., Minaev, N. V., Chichkov, B. N., Novikov, A. A., ... & Kublanov, I. V. (2020). *Tepidiforma bonchosmolovskayae* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic Chloroflexi bacterium from a Chukotka hot spring (Arctic, Russia), representing a novel class, *Tepidiformia*, which includes the previously uncultivated lineage OLB14. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(2), 1192-1202. doi: 10.1099/ijsem.0.003902.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453-4455. doi: 10.1093/bioinformatics/btz305.

- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., ... Nielsen, P. H. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, *59*(3), 671–682. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x.
- Kulski, J. (Ed.). (2016). Next Generation Sequencing: Advances, Applications and Challenges. *BoD–Books on Demand*.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, *35*(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Kumar Awasthi, M., Ravindran, B., Sarsaiya, S., Chen, H., Wainaina, S., Singh, E., ... & Zhang, Z. (2020). Metagenomics for taxonomy profiling: tools and approaches. *Bioengineered*, *11*(1), 356-374. doi: 10.1080/21655979.2020.1736238.
- Kunisawa, T. (2011). The phylogenetic placement of the non-phototrophic, Gram-positive thermophile ‘*Thermobaculum terrenum*’ and branching orders within the phylum ‘Chloroflexi’ inferred from gene order comparisons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *61*(8), 1944-1953. doi: 10.1099/ij.s.0.026088-0.
- Kuznetsov, B. B., Ivanovsky, R. N., Keppen, O. I., Sukhacheva, M. V., Bumazhkin, B. K., Patutina, E. O., ... & Skryabin, K. G. (2011). Draft genome sequence of the anoxygenic filamentous phototrophic bacterium *Oscillochloris trichoides* subsp. DG-6. *Journal of bacteriology*, *193*(1), 321-322. doi:10.1128/JB.00931-10.
- Lau, M. C. Y., Aitchison, J. C., & Pointing, S. B. (2008). Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles*, *13*(1), 139–149. doi:10.1007/s00792-008-0205-3.
- Laura, B.-G., Fuentes, P., García-Piñeres, A., & Uribe-Lorío, L. (2019). Tolerance and sorption of Bromacil and Paraquat by thermophilic cyanobacteria *Leptolyngbya* 7M from Costa Rican thermal springs. *Journal of Contaminant Hydrology*, 103539. doi:10.1016/j.jconhyd.2019.103539.

- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., & Gelfand, D. H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(11), 6427-6437.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, 49(W1), W293-W296.doi:10.1093/nar/gkab301.
- Li, J., Zhou, H., Fang, J., Sun, Y., & Dasgupta, S. (2014). Microbial distribution in different spatial positions within the walls of a black sulfide hydrothermal chimney. *Marine Ecology Progress Series*, 508, 67-85.
- Liu, L., Hu, N., Wang, B., Chen, M., Wang, J., Tian, Z., ... & Lin, D. (2011). A brief utilization report on the Illumina HiSeq 2000 sequencer. *Mycology*, 2(3), 169-191. doi: 10.1080/21501203.2011.615871.
- Liu, S., Li, C., Wang, H., Wang, S., Yang, S., Liu, X., ... Qin, F. (2020). Mapping regulatory variants controlling gene expression in drought response and tolerance in maize. *Genome Biology*, 21(1). doi:10.1186/s13059-020-02069-1
- López-López, O., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2013). Hot spring metagenomics. *Life*, 3(2), 308-320. doi: 10.3390/life3020308.
- López-López, O., Knapik, K., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2015). Metagenomics of an alkaline hot spring in Galicia (Spain): microbial diversity analysis and screening for novel lipolytic enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1291.doi: 10.3389/fmicb.2015.01291.
- Macario, A.J.L. (2007). *Encyclopedia of Stress* (2^a ed). doi: 10.1016/B978-012373947-6.00189-6.
- MacArthur, R. H., and E. O. Wilson. 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Maguire, F., Jia, B., Gray, K. L., Lau, W. Y. V., Beiko, R. G., & Brinkman, F. S. (2020). Metagenome-assembled genome binning methods with short reads disproportionately fail

- for plasmids and genomic islands. *Microbial genomics*, 6(10). doi:10.1099/mgen.0.000436
- Mahajan, G. B., & Balachandran, L. (2017). Sources of antibiotics: Hot springs. *Biochemical Pharmacology*, 134, 35–41. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.021.
- Mandal, T. N., Mahdi, A. A., Sharples, G. J., & Lloyd, R. G. (1993). Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *Journal of bacteriology*, 175(14), 4325-4334. doi:10.1128/jb.175.14.4325-4334.1993.
- Martinez, J. N., Nishihara, A., Lichtenberg, M., Trampe, E., Kawai, S., Tank, M., ... Thiel, V. (2019). Vertical Distribution and Diversity of Phototrophic Bacteria within a Hot Spring Microbial Mat (Nakabusa Hot Springs, Japan). *Microbes and Environments*. doi:10.1264/jsme2.me19047.
- Matsuura, N., Turlousse, D. M., Sun, L., Toyonaga, M., Kuroda, K., Ohashi, A., Cruz, R., Yamaguchi, T., & Sekiguchi, Y. (2015). Draft Genome Sequence of Anaerolineae Strain TC1, a Novel Isolate from a Methanogenic Wastewater Treatment System. *Genome announcements*, 3(5), e01104-15. doi:10.1128/genomeA.01104-15.
- McIlroy, S. J., Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., Fernando, E., Karst, S. M., Albertsen, M., & Nielsen, P. H. (2017). Culture-independent analyses reveal novel anaerolineaceae as abundant primary fermenters in anaerobic digesters treating waste activated sludge. *Frontiers in microbiology*, 8, 1134. doi:10.3389/fmicb.2017.01134.
- Mehetre, G. T., Paranjpe, A. S., Dastager, S. G., & Dharne, M. S. (2016). Complete metagenome sequencing based bacterial diversity and functional insights from basaltic hot spring of Unkeshwar, Maharashtra, India. *Genomics Data*, 7, 140-143. doi: 10.1016/j.gdata.2015.12.031.
- Mehta, D., & Satyanarayana, T. (2013). Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, 3–60. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-5899-5_1.

- Memory Tekere. (2011). Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *African journal of biotechnology*, 10(78). doi:10.5897/ajb11.899.
- Michael D Lee, GToTree: a user-friendly workflow for phylogenomics, *Bioinformatics*, Volume 35, Issue 20, 15 October 2019, Pages 4162–4164, doi:10.1093/bioinformatics/btz188.
- Mishra, S. (2020). Cyanobacterial imprints in diversity and phylogeny. *Advances in Cyanobacterial Biology*, 1–15. doi:10.1016/b978-0-12-819311-2.00001-2.
- Miura, Y., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2007). Significance of Chloroflexin Performance of Submerged Membrane Bioreactors (MBR) Treating Municipal Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 41(22), 7787–7794. doi:10.1021/es071263x.
- Momper, L., Hu, E., Moore, K. R., Skoog, E. J., Tyler, M., Evans, A. J., & Bosak, T. (2019). Metabolic versatility in a modern lineage of cyanobacteria from terrestrial hot springs. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 224-232. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.036.
- Murata, M., Ishii, A., Fujimoto, H., Nishimura, K., Kosaka, T., Mori, H., & Yamada, M. (2018). Update of thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. *PLoS one*, 13(2), e0189487. doi:10.1371/journal.pone.0189487.
- Nakamoto, H., Suzuki, N., & Roy, S. K. (2000). Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS letters*, 483(2-3), 169-174. doi:10.1016/S0014-5793(00)02097-4.
- Narayan, V. V., Hatha, M. A., Morgan, H. W., & Rao, D. (2008). Isolation and Characterization of Aerobic Thermophilic Bacteria from the Savusavu Hot Springs in Fiji. *Microbes and Environments*, 23(4), 350–352. doi:10.1264/jsme2.me08105.
- Nishiyama, E., Higashi, K., Mori, H., Suda, K., Nakamura, H., Omori, S., ... & Kurokawa, K. (2018). The relationship between microbial community structures and environmental parameters revealed by metagenomic analysis of hot spring water in the Kirishima area,

- Japan. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 202. doi: 10.3389/fbioe.2018.00202
- Nunoura, T., Hirai, M., Miyazaki, M., Kazama, H., Makita, H., Hirayama, H., Furushima, Y., Yamamoto, H., Imachi, H., & Takai, K. (2013). Isolation and characterization of a thermophilic, obligately anaerobic and heterotrophic marine Chloroflexi bacterium from a Chloroflexi-dominated microbial community associated with a Japanese shallow hydrothermal system, and proposal for Thermomarinilinea lacunofontalis gen. nov., sp. nov. *Microbes and environments*, 28(2), 228–235. doi: 10.1264/jsme2.me12193.
- Nyrén, P., & Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 504–509. doi:10.1016/0003-2697(85)90211-8.
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., ... & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, 44(D1), D733-D745. doi:10.1093/nar/gkv1189.
- Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á. y Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *Ciencia UAT*, 11(1), 79-90.
- Okazaki, Y., Nakano, S. I., Toyoda, A., & Tamaki, H. (2022). Long-read-resolved, ecosystem-wide exploration of nucleotide and structural microdiversity of lake bacterioplankton genomes. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2022.03.23.485478
- Pace, N. R. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, 276(5313), 734–740. doi:10.1126/science.276.5313.734.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. *Advances in Microbial Ecology*, 1–55. doi:10.1007/978-1-4757-0611-6_1.
- Padilla-Crespo, E., Yan, J., Swift, C., Wagner, D. D., Chourey, K., Hettich, R. L., ... & Löffler, F. E. (2014). Identification and environmental distribution of dcpA, which encodes the

- reductive dehalogenase catalyzing the dichloroelimination of 1, 2-dichloropropane to propene in organohalide-respiring Chloroflexi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(3), 808-818. doi: 10.1128/AEM.02927-13.
- Panday, D., & Das, S. K. (2010). *Chelatococcus sambhunathii* sp. nov., a moderately thermophilic alphaproteobacterium isolated from hot spring sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(4), 861-865. doi: 10.1099/ijs.0.013466-0.
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), 413–435. doi:10.1007/s13353-011-0057-x.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2014. Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25: 1043-1055.
- Parks, D. H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P.-A., Woodcroft, B. J., Evans, P. N., ... Tyson, G. W. (2017). Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology*, 2(11), 1533–1542. doi:10.1038/s41564-017-0012-7.
- Pask-Hughes, R & Williams, R. (1975). Extremely thermophilic gram-negative bacteria from hot tap water. *Microbiology*, 88(2), 321-328. doi: 10.1099/00221287-88-2-321
- Pathak, A. P., & Rathod, M. G. (2014). Cultivable bacterial diversity of terrestrial thermal spring of Unkeshwar, India. *J Biochem Tech*, 5, 814-818.
- Pentecost, A., Jones, B., & Renaut, R. W. (2003). What is a hot spring?. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 40(11), 1443-1446. doi:10.1139/e03-083.
- Philippe, H., Delsuc, F., Brinkmann, H., & Lartillot, N. (2005). Phylogenomics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36(1), 541–562. doi:10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130205.

- Pierson, B. K., & Castenholz, R. W. (1974). A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Archives of Microbiology*, *100*(1), 5–24. doi:10.1007/bf00446302.
- Selvarajan, R., Sibanda, T., & Tekere, M. (2018). Thermophilic bacterial communities inhabiting the microbial mats of “indifferent” and chalybeate (iron-rich) thermal springs: Diversity and biotechnological analysis. *MicrobiologyOpen*, *7*(2), e00560. doi: 10.1002/mbo3.560.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. FastTree 2: árboles de probabilidad para grandes alineaciones. *PLoS One* 10: e9490.
- Prieto-Barajas, C. M., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2018). Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application. *Electronic Journal of Biotechnology*, *31*, 48–56. doi:10.1016/j.ejbt.2017.11.001.
- Priya, I., Dhar, M. K., Bajaj, B. K., Koul, S., & Vakhlu, J. (2016). Cellulolytic Activity of Thermophilic Bacilli Isolated from Tattapani Hot Spring Sediment in North West Himalayas. *Indian Journal of Microbiology*, *56*(2), 228–231. doi:10.1007/s12088-016-0578-4.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 833. doi: 10.1038/nbt.3935.
- Rajaram, H., & Apte, S. K. (2008). Nitrogen status and heat-stress-dependent differential expression of the *cpn60* chaperonin gene influences thermotolerance in the cyanobacterium *Anabaena*. *Microbiology*, *154*(1), 317-325. doi: 10.1099/mic.0.2007/011064-0
- Ramette, A., & Tiedje, J. M. (2006). Biogeography: An Emerging Cornerstone for Understanding Prokaryotic Diversity, Ecology, and Evolution. *Microbial Ecology*, *53*(2), 197–207. doi:10.1007/s00248-005-5010-2
- Reichart, N. J., Bowers, R. M., Woyke, T., & Hatzenpichler, R. (2021). High potential for biomass-degrading enzymes revealed by hot spring metagenomics. *Frontiers in microbiology*, *12*. doi:10.3389/fmicb.2021.668238

- Reysenbach, A. L., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1994). Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.*, *60*(6), 2113-2119.
- Rhee, J. S., Ki, J. S., Kim, B. M., Hwang, S. J., Choi, I. Y., & Lee, J. S. (2012). HspA and HtpG enhance thermotolerance in the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* NIES-298. *Journal of microbiology and biotechnology*, *22*(1), 118-125. doi: 10.4014/jmb.1108.08001.
- Saiki, T., Kimura, R., & Arima, K. (1972). Isolation and characterization of extremely thermophilic bacteria from hot springs. *Agricultural and Biological Chemistry*, *36*(13), 2357-2366. doi:10.1080/00021369.1972.10860589.
- Saini, D. K., Pabbi, S., & Shukla, P. (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and chemical toxicology*, *120*, 616-624. doi:10.1016/j.fct.2018.08.002.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, *74*(12), 5463-5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sarmiento, F., Peralta, R., & Blamey, J. M. (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*, 148. doi: 10.3389/fbioe.2015.00148.
- Saxena, R., Dhakan, D. B., Mittal, P., Waiker, P., Chowdhury, A., Ghatak, A., & Sharma, V. K. (2017). Metagenomic analysis of hot springs in Central India reveals hydrocarbon degrading thermophiles and pathways essential for survival in extreme environments. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2123. doi:10.3389/fmicb.2016.02123
- Schneider, D., Arp, G., Reimer, A., Reitner, J., & Daniel, R. (2013). Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *PloS one*, *8*(6), e66662. doi: 10.1371/journal.pone.0066662.
- Schmidt, T. M. (Ed.). (2019). *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press.

- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 15;30(14):2068-9.
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., & Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature methods*, 9(8), 811-814. doi:10.1038/nmeth.2066.
- Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., & Kamagata, Y. (2003). Anaerolinea thermophila gen. nov., sp. nov. and Caldilinea aerophila gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 1843-1851. doi: 10.1099/ijs.0.02699-0.
- Sharma, N., Kumar, J., Abedin, M., Sahoo, D., Pandey, A., Rai, A. K., & Singh, S. P. (2020). Metagenomics revealing molecular profiling of community structure and metabolic pathways in natural hot springs of the Sikkim Himalaya. *BMC microbiology*, 20(1), 1-17. doi:10.1186/s12866-020-01923-3
- Shimura, Y., Hirose, Y., Misawa, N., Osana, Y., Katoh, H., Yamaguchi, H., & Kawachi, M. (2015). Comparison of the terrestrial cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. NIES-2104 and the freshwater *Leptolyngbya boryana* PCC 6306 genomes. *DNA Research*, 22(6), 403-412. doi: 10.1093/dnares/dsv022.
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Frontiers in microbiology*, 7, 529. doi:10.3389/fmicb.2016.00529.
- Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., & Madamwar, D. (2019). Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 323–332. doi:10.1016/b978-0-12-814849-5.00018-6.
- Sittenfeld, A., Mora, M., Ortega, J. M., Albertazzi, F., Cordero, A., Roncel, M., ... Serrano, A. (2002). Characterization of a photosynthetic Euglena strain isolated from an acidic hot mud pool of a volcanic area of Costa Rica. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(1), 151–161. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb01004.x.

- Sittenfeld, A., Vargas, M., Sánchez, E., Mora, M., & Serrano, A. (2004). Una nueva especie de Euglena (Euglenozoa: Euglenales) aislada de ambientes extremófilos en las Pailas de Barro del Volcán Rincón de la Vieja, Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 52(1), 27-30.
- Sokolova, T., González Grau, J. M., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Slepova, T. V., Bonch-Osmolovskaya, E. A., & Robb, F. T. (2004). *Thermosinus carboxydivorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, carbon-monoxide-oxidizing, hydrogenogenic bacterium from a hot pool of Yellowstone National Park. *Society for General Microbiology*. doi: 10.1099/ijs.0.63186-0.
- Sompong, U., Hawkins, P. R., Besley, C., & Peerapornpisal, Y. (2005). The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(3), 365–376. doi:10.1016/j.femsec.2004.12.007.
- Speirs, L., Rice, D. T., Petrovski, S., & Seviour, R. J. (2019). The phylogeny, biodiversity, and ecology of the chloroflexi in activated sludge. *Frontiers in microbiology*, 10, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2019.02015.
- Sprague, S. G., Staehelin, L. A., DiBartolomeis, M. J., & Fuller, R. C. (1981). Isolation and development of chlorosomes in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of bacteriology*, 147(3), 1021-1031. doi:10.1128/jb.147.3.1021-1031.1981.
- Stolz, J. F. (2000). Structure of Microbial Mats and Biofilms. *Microbial Sediments*, 1–8. doi:10.1007/978-3-662-04036-2_1.
- Strazzulli, A., Fusco, S., Cobucci-Ponzano, B., Moracci, M., & Contursi, P. (2017). Metagenomics of microbial and viral life in terrestrial geothermal environments. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(3), 425-454. doi:10.1007/s11157-017-9435-0.
- Sun, L., Toyonaga, M., Ohashi, A., Matsuura, N., Tourlousse, D. M., Meng, X. Y., ... & Sekiguchi, Y. (2016). Isolation and characterization of *Flexilinea flocculi* gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class Anaerolineae in the

- phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 988-996. doi:10.1099/ijsem.0.000822.
- Suzuki, I., Kanasaki, Y., Hayashi, H., Hall, J. J., Simon, W. J., Slabas, A. R., & Murata, N. (2005). The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant physiology*, 138(3), 1409-1421. doi: 10.1104/pp.104.059097.
- Tang, J., Jiang, D., Luo, Y., Liang, Y., Li, L., Shah, M. M. R., & Daroch, M. (2018). Potential new genera of cyanobacterial strains isolated from thermal springs of western Sichuan, China. *Algal Research*, 31, 14–20. doi:10.1016/j.algal.2018.01.008.
- Tekere, M., Prinsloo, A., Olivier, J., Jonker, N., & Venter, S. N. (2012). An evaluation of the bacterial diversity at Tshipise, Mphephu and Sagole hot water springs, Limpopo Province, South Africa. *UPSspace Institutional Repository*.
- Thiel, V., Fukushima, S.-I., Kanno, N., & Hanada, S. (2019). Chloroflexi. *Reference Module in Life Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20771-1.
- Thiel, V., Hamilton, T. L., Tomsho, L. P., Burhans, R., Gay, S. E., Schuster, S. C., Ward, D. M., & Bryant, D. A. (2014). Draft Genome Sequence of a Sulfide-Oxidizing, Autotrophic Filamentous Anoxygenic Phototrophic Bacterium, *Chloroflexus* sp. Strain MS-G (Chloroflexi). *Genome announcements*, 2(5), e00872-14. doi:10.1128/genomeA.00872-14.
- Thomas, S. C., Payne, D., Tamadonfar, K. O., Seymour, C. O., Jiao, J. Y., Murugapiran, S. K., ... & Hedlund, B. P. (2021). Genomics, exometabolomics, and metabolic probing reveal conserved proteolytic metabolism of *Thermoflexus hugenholtzii* and three candidate species from China and Japan. *Frontiers in microbiology*, 12, 636. doi:10.3389/fmicb.2021.632731.
- Turro, E., Su, S.-Y., Gonçalves, Â., Coin, L. J., Richardson, S., & Lewin, A. (2011). Haplotype and isoform specific expression estimation using multi-mapping RNA-seq reads. *Genome Biology*, 12(2), R13. doi:10.1186/gb-2011-12-2-r13.

- Uribe-Lorío, L., Brenes-Guillén, L., Hernández-Ascencio, W., Mora-Amador, R., González, G., Ramírez-Umaña, C. J., ... Pedrós-Alió, C. (2019). The influence of temperature and pH on bacterial community composition of microbial mats in hot springs from Costa Rica. *MicrobiologyOpen*. doi:10.1002/mbo3.893.
- Van der Meer, M. T., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J. S., de Leeuw, J. W., & Ward, D. M. (2003). Compound-specific isotopic fractionation patterns suggest different carbon metabolisms among Chloroflexus-like bacteria in hot-spring microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6000-6006. doi:10.1128/AEM.69.10.6000-6006.2003.
- Van Rossum, T., Ferretti, P., Maistrenko, O. M., & Bork, P. (2020). Diversity within species: interpreting strains in microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 18(9), 491-506. doi:10.1038/s41579-020-0368-1.
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 641-658. doi:10.1373/clinchem.2008.112789.
- Wada, H., & Murata, N. (1998). Membrane Lipids in Cyanobacteria. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 65-81. doi:10.1007/0-306-48087-5_4.
- Wahlund, T. M., Woese, C. R., Castenholz, R. W., & Madigan, M. T. (1991). A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 156(2), 81-90. doi:10.1007/bf00290978.
- Wang, L., Zheng, P., Chen, T., Chen, J., Xing, Y., Ji, Q., ... Zhang, J. (2012). Performance of autotrophic nitrogen removal in the granular sludge bed reactor. *Bioresource Technology*, 123, 78-85. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.112.
- Wang, Q. P., & Kaguni, J. M. (1989). dnaA protein regulates transcriptions of the rpoH gene of Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 264(13), 7338-7344. doi:10.1016/S0021-9258(18)83238-0.

- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., & Bateson, M. M. (1998). A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1353–1370. doi:10.1128/membr.62.4.1353-1370.1998.
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. *FEMS Microbiology Letters*, 75(2-3), 105–115. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04088.x.
- Ward, L. M., Hemp, J., Shih, P. M., McGlynn, S. E., & Fischer, W. W. (2018). Evolution of Phototrophy in the Chloroflexi Phylum Driven by Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 9, 260. doi:10.3389/fmicb.2018.00260.
- Ward, L. M., McGlynn, S. E., & Fischer, W. W. (2018). Draft Genome Sequences of Two Basal Members of the Anaerolineae Class of Chloroflexi from a Sulfidic Hot Spring. *Genome announcements*, 6(25), e00570-18. doi:10.1128/genomeA.00570-18.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M.,Barton, G.J (2009), "Jalview version 2: A Multiple Sequence Alignment and Analysis Workbench. *Bioinformatics* 25 (9) 1189-1191 doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Weller, R. O. L. A. N. D., Bateson, M. M., Heimbuch, B. K., Kopczynski, E. D., & Ward, D. M. (1992). Uncultivated cyanobacteria, Chloroflexus-like inhabitants, and spirochete-like inhabitants of a hot spring microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(12), 3964-3969.
- Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., & Daniel, R. (2013). Microbial Diversity and Biochemical Potential Encoded by Thermal Spring Metagenomes Derived from the Kamchatka Peninsula. *Archaea*, 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/136714.
- Wiegel, J., & Ljungdahl, L. G. (1981). *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*, 128(4), 343–348. doi:10.1007/bf00405910.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271.
- Wu, D., Raymond, J., Wu, M., Chatterji, S., Ren, Q., Graham, J. E., Bryant, D. A., Robb, F., Colman, A., Tallon, L. J., Badger, J. H., Madupu, R., Ward, N. L. & Eisen, J. A. (2009).

- Complete genome sequence of the aerobic CO-oxidizing thermophile *Thermomicrobium roseum*. *PLoS One*, 4(1), 42- 47. doi: 10.1371/journal.pone.0004207.
- Wu, M., & Scott, A. J. (2012). Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. *Bioinformatics*, 28(7), 1033-1034.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., & Yokota, A. (2010). *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost, description of Thermosporotrichaceae fam. nov. within the class Ktedonobacteria Cavalitti et al. 2007 and emended description of the class Ktedonobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(8), 1794-1801. doi: 10.1099/ijs.0.018069-0.
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., & Sekiguchi, Y. (2007). *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2299-2306. doi: 10.1099/ijs.0.65098-0.
- Yamamoto, H., Hiraishi, A., Kato, K., Chiura, H. X., Maki, Y., & Shimizu, A. (1998). Phylogenetic Evidence for the Existence of Novel Thermophilic Bacteria in Hot Spring Sulfur-Turf Microbial Mats in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1680–1687. doi:10.1128/aem.64.5.1680-1687.1998.
- Yim, L. C., Hongmei, J., Aitchison, J. C., & Pointing, S. B. (2006). Highly diverse community structure in a remote central Tibetan geothermal spring does not display monotonic variation to thermal stress. *FEMS microbiology ecology*, 57(1), 80-91. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00104.x.
- Yohda, M., Ikegami, K., Aita, Y., Kitajima, M., Takechi, A., Iwamoto, M., ... & Komatsu, D. (2017). Isolation and genomic characterization of a *Dehalococcoides* strain suggests genomic rearrangement during culture. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. doi:10.1038/s41598-017-02381-0.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J. M., Kwon, S.J. & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110:1281–1286.

Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(3), 95–109. doi:10.1016/j.jgg.2011.02.003.

Zheng, Y., Wang, C. M., Sakai, Y., Abe, K., Yokota, A., & Yabe, S. (2019). *Thermogemmatispora aurantia* sp. nov. and *Thermogemmatispora argillosa* sp. nov., within the class Ktedonobacteria, and emended description of the genus *Thermogemmatispora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(6), 1744-1750. doi: 10.1099/ijsem.0.003388.

Zhou, H., Li, J., Peng, X., Meng, J., Wang, F., & Ai, Y. (2009). Microbial diversity of a sulfide black smoker in main endeavour hydrothermal vent field, Juan de Fuca Ridge. *The Journal of Microbiology*, 47(3), 235–247. doi:10.1007/s12275-008-0311-z.

9. Anexos

Anexo 1. Descripción de genomas del filo Chloroflexi obtenidos en las bases de datos del NCBI.

Nombre	Número de acceso	Sitio de aislamiento	Tamaño	Contigs	%GC	Referencias Bibliográficas asociadas
Chloroflexus sp. Y-396-1	NZ_AZ XV0000000.1	Vida libre / Mesófilo	4.89	4	53.9	
Chloroflexus sp. MS-G	NZ_JPIM0000000.1	Mushroom Spring, Yellowstone National Park, USA (60°)	4.77	251	54.3	Thiel <i>et al.</i> , 2014. doi:10.1128/genomeA.00872-14
Chloroflexi oral taxon 439_Ch1	APVI000000.1		1.09	168	53.9	
Chloroflexi oral taxon 439_Ch2	APVJ000000.1		1.16	113	53.9	
Chloroflexi oral taxon 439_Ch1-2	APVK000000.1		1.76	242	53.7	
Chloroflexus aurantiacus J-10-fl	NC_010175.1	Fotótrofo termofílico. Temperatura óptima:	5.25	1	56.7	

		52-60. Viven en fuentes termales con pH neutro hasta ácido				
Chloreflexus aurantiacus Y-400-fl	NC_012032.1		5.26	1	56.7	
Chloroflexus aurantiacus UBA8861	DOPW0000000.1		5.05	300	56.3	
Dehalococcoides mccartyi 195	NC_002936.3	Mesófilico. Anaerobio. Temperatura óptima: 35°. Se encuentran en lugares contaminados	1.47	1	48.9	Yohda <i>et al.</i> , 2017 .doi:10.1038/s41598-017-02381-0
Dehalococcoides mccartyi CG5	NZ_CP006951.1	Aislado de ambientes contaminados	1.36	1	47.2	Wang <i>et al.</i> , 2014.doi:10.1073/pnas.1404845111
Dehalococcoides mccartyi CG3	NZ_CP013074.1		1.52	1	46.9	Parks <i>et al.</i> , 2017.doi:10.1038/s41564-017-0012-7
Dehalococcoides mccartyi CG1	NZ_CP006949.1	Mesófilo. Temperatura óptima: 27.5 °C. pH óptimo: 7	1.49	1	46.9	
Dehalococcoides mccartyi 11a5	NZ_CP011127.1		1.46	2	46.87	Low <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1038/srep15204
Dehalococcoides mccartyi BTF08	NC_020387.1	Aislado de sitio contaminado Bitterfeld, Germany	1.45	1	47.3	Pöritz <i>et al.</i> , 2013.doi:10.1111/1574-6968.12160
Dehalococcoides mccartyi IBARAKI	NZ_AP014563.1		1.45	1	47	
Dehalococcoides mccartyi DCMB5	NC_020386.1	ambiente acuático. Agua dulce. Aislado de Spittelwasser creek, Bitterfeld, Germany	1.43	1	47.1	Pöritz <i>et al.</i> , 2013.doi:10.1111/1574-6968.12160.
Dehalococcoides mccartyi KBDCA1	NZ_CP019867.1		1.43	1	47.4	
Dehalococcoides mccartyi FL2	NZ_CP038470.1		1.42	1	47	He <i>et al.</i> , 2005.doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00830.x
Dehalococcoides mccartyi VS	NC_013552.1	Agua dulce y profundas. Mésofilo. En ambientes contaminados con tetracloroetano.	1.41	1	47.3	Müller <i>et al.</i> , 2014.doi:10.1128/AEM.70.8.4880-4888.2004

		Aislado de Texas, USA				
Dehalococcoides mccartyi GY50	NC_022964.1	Mesófilo. Temperatura óptima:30 °C	1.41	1	47	
Dehalococcoides mccartyi CBDB1	NC_007356.1	Temperatura: Mesófilo. Ambientes: sedimentos, agua dulce. Aislado de: sedimento anóxico de río	1.4	1	47	Adrian <i>et al.</i> , 2000.doi:10.1038/35046063
Dehalococcoides mccartyi KBDCA2	NZ_CP019868.1		1.39	1	47.5	
Dehalococcoides mccartyi KBTCE1	NZ_CP019999.1		1.39	1	47.3	
Dehalococcoides mccartyi UCH-ATV1	NZ_AP017649.1		1.39	1	48.8	Yohda <i>et al.</i> , 2017 .doi:10.1038/s41598-017-02381-0
Dehalococcoides mccartyi UCH-ATV1	NZ_AP017649.1		1.39	1	48.8	Yohda <i>et al.</i> , 2017 .doi:10.1038/s41598-017-02381-0
Dehalococcoides mccartyi CG4	NZ_CP006950.1		1.38	1	47.8	
Dehalococcoides mccartyi GT	NC_013890.1	Agua dulce. Aislado de un acuífero contaminado con cloroetano	1.36	1	47.3	
Dehalococcoides mccartyi KBVC1	NZ_CP019968.1		1.36	1	47.3	
Dehalococcoides mccartyi BAV1	NC_009455.1	Agua dulce. Aislado de ambiente contaminado en Michigan, USA.	1.34	1	47.2	
Dehalococcoides mccartyi KBVC2	NZ_CP019969.1		1.34	1	47.2	
Dehalococcoides mccartyi KBDCA3	NZ_CP019946.1		1.34	1	47.6	
Dehalococcoides mmccartyi KBTCE2	NZ_CP019865.1		1.33	1	49.1	
Dehalococcoides mccartyi KBTCE3	NZ_CP019866.1		1.27	1	49.3	
Dehalococcoides mccartyi	NZ_JPRE00		1.43	6	47	Wang <i>et al.</i> ,

SG1	000000.1					2014.doi:10.1073/pnas.1404845111
Dehalococcoides mccartyi JNA	NZ_JSWM0000000.1		1.46	7	47	
Dehalococcoides mccartyi 11a	NZ_JGVX0000000.1		1.32	6	47.2	
Dehalococcoides mccartyi GEO	NZ_PQVQ0000000.1		1.44	27	48.9	
Dehalococcoides mccaty KS	NZ_QGLD0000000.1		1.49	23	47.2	Padilla-Crespo <i>et al.</i> , 2013.doi:10.1128/AEM.02927-13
Dehalococcoides mccarty RC	NZ_QGLC0000000.1		1.5	25	47.2	Padilla-Crespo <i>et al.</i> , 2013.doi:10.1128/AEM.02927-13
Dehalococcoides mccarty MB	NZ_JGYD0000000.1		1.57	33	48.2	Padilla-Crespo <i>et al.</i> , 2013.doi:10.1128/AEM.02927-13
Dehalococcoides mccartyi WBC-2	CP017572.1		1.37	1	47.4	Molenda <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1128/AEM.02017-15
Dehalococcoides mccartyi EV-TCE	LZFJ0000000.1		1.36	8	48.6	
Dehalococcoides mccartyi UBA5554	DIMY0000000		1.38	7	47.1	
Dehalococcoides mccartyi UBA5545	DINH0000000		1.34	9	47.2	
Dehalococcoides mccartyi UBA5818	DICU0000000		1.38	5	48.7	
Dehalococcoides mccartyi EV-VC	LZFK0000000		1.47	16	46.8	
Dehalococcoides mccartyi UBA5846	DJGM0000000		1.03	81	47.9	Parks <i>et al.</i> , 2017.doi:10.1038/s41564-017-0012-7
Dehalococcoides mccartyi UBA5853	DJGF0000000		1.24	128	47.3	
Dehalococcoides mccartyi KKB3.003	PHFC0000000		1.35	403	0	Dam <i>et al.</i> , 2017.doi:10.1093/femsec/fix151
Dehalococcoides mccartyi H1-3-2.001	PHFD0100000		1.33	481	0	Dam <i>et al.</i> , 2017.doi:10.1093/femsec/fix151

Dehalococcoides UCH007	NZ_AP014722.1		1.47	1	46.9	
Dehalococcoides JdFR-54	MTNP0000000	Acuático. Halofílico. Aislado de subsuelo oceánico	1.69	67	59.7	Jungbluth <i>et al.</i> , 2017.doi:10.1038/sdata.2017.37
Dehalococcoides JdFR-56	MTNR0000000	Acuático. Halofílico. Aislado de subsuelo oceánico	1.8	95	57	
Dehalococcoides JdFR-58	MTNT0000000	Acuático. Halofílico. Aislado de subsuelo oceánico	0.91	203	54.8	
Dehalococcoides JdFR-55	MTNQ0000000	Acuático. Halofílico. Aislado de subsuelo oceánico	0.55	132	62.8	
Dehalococcoides JdFR-57	MTNS0000000	Acuático. Halofílico. Aislado de subsuelo oceánico	0.78	207	57.7	
Ktedonobacter racemifer DSM44963	NZ_ADV00000000.1	Temperatura óptima:31 °C. Aislado de suelo, Italia	13.66	12	53.8	Chang <i>et al.</i> , 2011.doi: 10.4056/sigs.2114901
Ktedonobacter 13_2_20CM_2_56_8	MNDS0000000	*suelo*	2.89	238	53.5	Butterfield <i>et al.</i> , 2016.doi:10.7717/peerj.2687
Ktedonobacter 12_1_20CM_4_53_11	MNIY0000000		2.58	223	53.4	
Ktedonobacter 13_1_20CM_3_54_15	MNJJ0000000		3.14	298	53.7	
Ktedonobacter 13_2_20CM_53_11	MNDA0000000		5.04	719	53.5	
Ktedonobacter 13_1_40CM_4_52_4	MNFP0000000		1.38	209	51.8	
Ktedonobacter UBA10473	DMFQ0000000		4.36	1439	50.1	
Ktedonobacter UBA7999	DPSZ0000000		5.2	2110	47.3	
Ktedonobacter UBA10879	DMCL0000000		3.31	1009	49.9	
Ktedonobacter 13_1_20CM_4_53_7	MNIQ0000000		1.38	446	52.7	
Ktedonobacter UBA11362	DNPD0000000		3.3	1232	49.2	

Ktedonobacter 13_2_20CM_2_54_8	MNDO00000000		2.02	679	53.8	
Ktedonobacter UBA10489	DPEU00000000		4.91	1932	49.3	
Ktedonobacter UBA10491	DMZA00000000		3.95	1623	48.4	
Ktedonobacter UBA11361	DNPA00000000		2.61	820	51.3	
Ktedonobacter UBA10483	DPSY00000000		4.01	1698	49.6	
Ktedonobacter UBA10454	DQDQ00000000		3.08	1597	48.4	
Leptolinea UBA5203	DHVR00000000		4.44	94	46.4	Parks <i>et al.</i> , 2017.doi:10.1038/s41564-017-0012-7
Leptolinea UBA4782	DHHC00000000		2.26	75	52.5	
Leptolinea UBA2195	DCVF00000000		2.2	125	52.5	
Leptolinea UBA5366	DHPK00000000		2.6	212	47.6	
Leptolinea UBA1437	DCTP00000000		2	244	43.1	
Leptolinea UBA1387	DBQT00000000		2.79	463	41.2	
Leptolinea tardivitalis	NZ_LGCK0000000.1		3.68	15	46.8	Ward <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1128/genomeA.01356-15
Candidatus Chloroploca Khr17	NZ_RYFF0000000.1	Sedimento superficial de un lago, Rusia	6.38	183	58.8	
Candidatus Chloroploca M-50	NZ_SIJK0000000.1	Mat microbiano en zona costera, Mongolia	6.42	298	58.5	
Candidatus Promineofilum breve Cfx-k	NZ_LN890655.1		3.99	3	64.2	
Oscillochloris trichoides DG-6	NZ_ADVR0000000.1	Temperatura óptima: 28-30. Aislado de mat microbiano en manantial con sulfuro de hidrógeno, Rusia	4.31	4.37	59.2	Kuznetsov <i>et al.</i> , 2011.doi:10.1128/JB.00931-10
Kallotenue CFH73958	NZ_VIYF00	Sedimento de fuente	8.85	305	64.9	

	000000.1	termal, China				
Anaerolinea thermolimosa	NZ_BBXW00000000.1	Temperatura óptima:50 °C. Aislado de lodo de un reactor, Japón.	4.17	81	54.5	Matsuura <i>et al.</i> , 2015. doi: 10.1128/genomeA.00975-15
Anaerolinea 4484_236	MZGP00000000	Aislado de sedimentos hidrotermales de aguas profundas, Golfo de California	1.96	301	48.6	Dombrowski <i>et al.</i> , 2018.doi:10.1038/s41467-018-07418-0
Anaerolinea SZUA-506	QKFQ00000000	Aislado de sedimento hidrotermal, Océano Atlántico Sur.	1.46	553	57.1	
Anaerolinea_RIFOXY_FULL60_12	MEMW00000000		0.5	630	54	
Anaerolinea thermophila UN11	NC_014960.1	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de lodo en aguas residuales, Japón	3.53	1	53.8	Sekiguchi <i>et al.</i> , 2003.doi: 10.1099/ijs.0.02699-0
Anaerolineales bacterium FeB_25	NZ_PQAL0000000.1		4.45	50	51.2	
Roseiflexus RS-1	NC_009523.1	Aislado de mat microbiano en fuente termal. Facultativo. Termofílico	5.8	1	60.4	
Chloroflexus aggregans DSM94895	NC_011831.1	Agua dulce. Aislado de fuente termal, Japón (55 °C)	4.68	1	56.4	Hanada <i>et al.</i> , 1995.doi:10.1099/00207713-45-4-676.
Chloroflexus aggregans	PNIQ00000000	Aislado de dos piscinas termales, Kamchatka,Rusia	3.19	1	54.8	
Roseiflexus castenholzii DSM13941	NC_009767.1	Aislado de mat microbiano en fuente termal, Nakabusa, Japón. Marino. Temperatura 50 °C	5.72	1	60.7	Hanada <i>et al.</i> , 2002.doi:10.1099/00207713-52-1-187
Roseiflexus castenholzii	PNIR00000000	Aislado de dos piscinas termales, Kamchatka,Rusia	4.75	1224	60.2	
Dehalogenimonas GP	NZ_JQAN0000000.2	Aislado de suelo	2.02	16	52.1	Yang <i>et al.</i> , 2017.doi: 10.1038/ismej.2017.127
Dehalogenimonas WBC-2	PRJNA269960	Aislado de suelo	1.73	1	49.2	Molenda <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1128/AEM.02017-

						15
Dehalogenimonas formicexedens	NZ_CP018258.1	Temperatura óptima 32 °C. Aislado de agua subterránea contaminada.	2.09	1	54	Key <i>et al.</i> , 2017. doi:10.1099/ijsem.0.001819
Thermomicrobium roseum DSM5159	NC_011959.1	Temperatura óptima: 70 °C. Aislado de aguas termales, Yellowstone, USA	2.92	2	64.25	Wu <i>et al.</i> , 2009. doi:10.1371/journal.pone.0004207
Thermomicrobium roseum SpSt-222	DSJL0000000	Aislado de sedimento de agua termal, Canadá.	3	14	61.6	Zhou <i>et al.</i> , 2020. doi:10.1128/mSystems.00795-19
Thermomicrobium roseum SpSt-171	DSHG00000000		3.07	15	61.5	
Thermomicrobium roseum SpSt-283	DSMA00000000.1		3.04	36	61.5	
Pelolinea submarina MO-CFX1	NZ_AP018437.1	Temperatura óptima: 25 °C. Aislado de sedimento superficial marino, Shimokita, Japón, Océano Pacífico.	3.52	1	50.6	Imachi <i>et al.</i> , 2014. doi:10.1099/ijms.0.057547-0
Pelolinea submarina DSM23923	NZ_QUMS00000000.1	Temperatura óptima: 25 °C. Aislado de sedimento superficial marino, Shimokita, Japón, Océano Pacífico.	3.52	13	50.6	
Bellilinea caldifistulae GOMI1	NZ_LGHJ00000000.1	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de lodo digestor termofílico, Niigata, Japón	3.66	31	52.8	Yamada <i>et al.</i> , 2007. doi:10.1099/ijms.0.65098-0.
Bellilinea caldifistulae	NZ_BBXX00000000.1	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de lodo digestor termofílico, Niigata, Japón	3.65	43	52.8	
Chloroflexia bacterium WB430869	RFTC0000000.1		2.69	944	53.3	
Chloroflexia bacterium	RZZQ000000		7.37	3807	58.9	

INTAAUR084	000.1					
Herpetosiphon llansteffanensis	NZ_PUBZ0000000.1		6.14	169	50.8	
Herpetosiphon geysericola	NZ_LGKP0000000.1	Aislado de fuente termal, Mexico	6.14	46	50.7	Ward <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1128/genomeA.01352-15
Thermoflexus hugenholtzii JAD2	NZ_FYEK0000000.1	Temperatura óptima:75 °C. Aislado de sedimento Great Boiling Spring, Nevada, USA.	3.22	87	67.3	Dodsworth <i>et al.</i> , 2014. doi: 10.1099/ijms.0.055855-0
Thermoflexus hugenholtzii G233	NZ_PDJQ0000000.1		2.74	1	69.4	
Chloroflexus islandicus	NZ_LWQS0000000.1	Termofílico. Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de una suspensión de agua y arena del géiser, Iceland	5.14	131	60.6	Gaisin <i>et al.</i> , 2017.doi: 10.1099/ijsem.0.001820
Caldilinea aerophila DSM 14535	NC_017079.1	Termofílico. Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de césped de azufre en fuente termal, Nakao, Japón	5.14	1	58.8	Zhou <i>et al.</i> , 2020. doi:10.1128/mSystems.00795-19
Caldilinea aerophila 193	DSIE0000000.1		5.14	206	58.8	
Caldilinea aerophila 289	DSMG0000000.1		5.01	215	58.9	
Nitrolancea hollandica LB	NZ_CAGS0000000.1	Temperatura óptima: 35 °C. Aislado de un reactor de nitrificación, Praga, República Checa	3.89	736	62.6	Sorokin <i>et al.</i> , 2014.doi: 10.1099/ijms.0.062232-0
Sphaerobacter thermophilus ZC4RG26	QGVB0000000.1		3.92	412	68.2	
Sphaerobacter thermophilus DSM20745	NC_013523.1	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de Lodos de aguas residuales tratados térmicamente, Alemania	2.74	2	68.1	Spring <i>et al.</i> , 2010. doi:10.4056/sigs.581048
Dehalogenimonas	NC_014314.1	Temperatura óptima	1.69	1	55	Siddaramappa <i>et al.</i> , 2012.

lykanthroporepellens BLDC9	1	31 °C. Aislado de un pozo de residuos, USA				doi:10.4056/sigs.2806097
Dehalogenimonas alkenigignens IP3-3	NZ_LFDV0000000.1	Temperatura óptima: 30 °C. Aislado de aguas subterráneas contaminadas	1.85	2	55.9	Key <i>et al.</i> , 2017. doi:10.1099/ijsem.0.001819
Dictyobacter vulcani W12	NZ_BKZW0000000.1	Temperatura: 30 °C. Aislado del suelo del volcán Miyagi, Japón	7.42	7	49.7	
Dictyobacter alpinus	NZ_BIFT0000000.1		8.96	4	49.7	
Dictyobacter kobayashii	NZ_BIFS0000000.1		8.85	2	50.3	Wang <i>et al.</i> , 2019. doi:10.1099/ijsem.0.003396
Dictyobacter aurantiacus	NZ_BIFQ0000000.1		8.88	2	54	
Thermogemmatisspora aurantia	NZ_BKZV0000000.1	Aislado de suelo geotérmico, Japón	5.6	28	60.7	Zheng <i>et al.</i> , 2019. doi:10.1099/ijsem.0.003388
Thermogemmatisspora tikiterensis	NZ_MCIF0000000.1		5.97	61	60.7	
Thermogemmatisspora onikobensis	NZ_BDGT0000000.1	Temperatura óptima: 65 °C. Aislado de hojas caídas en suelo geotérmico de las aguas termales, Japón	5.56	112	61.1	
Thermogemmatisspora carboxidivorans	NZ_JNIM0000000.1	Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de tapete microbiano sobre árbol calentado geotérmicamente	5.61	1	60.9	
Tepidiforma bonchosmolovskayae	NZ_CP042829.1	Aislado de fuente termal, Rusia	2.75	1	69.9	Kochetkova <i>et al.</i> , 2020. doi:10.1099/ijsem.0.003902
Ktedonosporobacter rubrisoli	NZ_CP035758.1	Temperatura: 28 °C. Aislado de suelo rojo, Wushan, China	11.34	1	51.8	
Tengunoibacter tsumagoiensis	NZ_BIFR0000000.1	*suelo*	7.7	2	49.4	Wang <i>et al.</i> , 2019. doi:10.1099/ijsem.0.003396
Thermosporothrix hazakensis ATCC BAA1881	NZ_OKUF0000000.1	Temperatura: 50 °C. Aislado de compost, Japón	7.28	95	53	
Thermanaerotherix daxensis	NZ_LGK0000000.1	Temperatura óptima: 60 °C. Aislado de	3.01	6	56	Pace <i>et al.</i> , 2015. doi:10.1128/genomeA.01354-1

		acuífero caliente, Francia				5
Brevefilum fermentans	NZ_LT8599 58.1		2.57	1	49.1	Mcllroy <i>et al.</i> , 2017.doi:10.3389/fmicb.2017.0 1134
Litorilinea aerophila ATCC BAA2444	NZ_VIGC0 0000000.1		6.19	318	64.2	
Litorilinea aerophila PRI413	JWSX00000 000.1	*Temperatura óptima: 55 °C. Aislado de fuente termal, Nueva Zelanda	5.81	2497	64.5	
Ornatilinea apprima	NZ_LGCL0 0000000	Temperatura óptima:43.5 °C. Aislado de un pozo de agua caliente, Rusia	4.34	45	55	Hemp <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1128/genomeA.01 353-15
Ardenticatena maritima	NZ_BBZA0 0000000.1	Temperatura óptima:65.5 °C. Aislado de campo hidrotermal, Japón	3.57	444	59.6	Kawaichi <i>et al.</i> , 213.doi:10.1099/ijls.0.046532-0
Flexilinea flocculi	NZ_BBYH0 0000000	Temperatura óptima: 37 °C	3.51	16	41.4	Matsuura <i>et al.</i> , 2015. doi: 10.1128/genomeA.00975-15
Levilinea saccharolytica	NZ_BBXZ0 0000000.1	Temperatura óptima: 37 °C	4.22	196	59.3	Hemp <i>et al.</i> , 2015.doi:10.1128/genomeA.01 357-15
Longilinea arvoryzae	NZ_BBXY0 0000000.1	Temperatura óptima: 37 °C	4.44	25	56.9	Matsuura <i>et al.</i> , 2015. doi: 10.1128/genomeA.00975-15
Thermorudis peleae	NZ_QJMP0 0000000.1	Temperatura óptima: 65 °C. Aislado de tapete microbiano en tumulus geotérmico. Hawaii	2.93	4	59.9	

Anexo 2. Lista de genes termotolerantes reportados en *Escherichia coli* según Murata y colaboradores (2018).

Clasificación	Gen	Definición
Metabolismo Energético	<i>aceE</i>	Metabolismo del Piruvato
	<i>aceF</i>	Metabolismo del Piruvato
	<i>lpd</i>	Metabolismo del Piruvato

	<i>lipA</i>	Metabolismo del Piruvato
	<i>ackA</i>	Metabolismo del Piruvato
	<i>rpe</i>	Ruta Pentosa Fosfato
	<i>cydB</i>	Cadena Respiratoria
	<i>yhcB</i>	Cadena Respiratoria
	<i>atpA</i>	Fosforilación oxidativa
	<i>atpD</i>	Fosforilación oxidativa
	<i>atpG</i>	Fosforilación oxidativa
	<i>nuoC</i>	Fosforilación oxidativa
	<i>gntK</i>	Ruta Pentosa Fosfato
	<i>phnN</i>	Ruta Pentosa Fosfato
	<i>ubiE</i>	Biosíntesis de ubiquinona
	<i>ubiX</i>	Biosíntesis de ubiquinona
	<i>dapF</i>	Metabolismo de aminoácidos
	<i>trpB</i>	Metabolismo de aminoácidos
	<i>pdxH</i>	Metabolismo vitamina B6
	<i>ybhH</i>	Proteína Hipotética
Estabilización de la membrana externa	<i>gmhB</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>lpcA</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>rfaC</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>rfaD</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>rfaE</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>rfaF</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>rfaG</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>lpxL</i>	Biosíntesis de lipopolisacáridos
	<i>ydcL</i>	Lipoproteína asociada a peptidoglicano
	<i>yfgL</i>	Lipoproteína asociada a peptidoglicano
	<i>ynbE</i>	Lipoproteína asociada a peptidoglicano
	<i>nLpl</i>	Lipoproteína asociada a peptidoglicano
	<i>ycdO</i>	Lipoproteína asociada a peptidoglicano
	<i>pal</i>	Integridad de la membrana externa
	<i>tolQ</i>	Integridad de la membrana externa
	<i>tolR</i>	Integridad de la membrana externa
<i>yciM</i>	Integridad de la membrana externa	
	<i>fimG</i>	Sistema de secreción

Reparación del ADN	<i>dnaQ</i>	Replicación y reparación del ADN
	<i>holC</i>	Replicación y reparación del ADN
	<i>priA</i>	Replicación y reparación del ADN
	<i>ruvA</i>	Replicación y reparación del ADN
	<i>ruvC</i>	Replicación y reparación del ADN
	<i>yraN</i>	Proteína Hipotética
Modificación del ARNt	<i>iscS</i>	Modificación del ARNt
	<i>tusB</i>	Modificación del ARNt
	<i>tusC</i>	Modificación del ARNt
	<i>tusD</i>	Modificación del ARNt
	<i>tusA</i>	Modificación del ARNt
	<i>yccM</i>	Modificación del ARNt
	<i>miaA</i>	Modificación del ARNt
	<i>trmU</i>	Modificación del ARNt
	<i>truA</i>	Modificación del ARNt
Chaperonas	<i>dnaJ</i>	Sistema de Chaperonas
	<i>dnaK</i>	Sistema de Chaperonas
	<i>degP</i>	Sistema de Chaperonas
	<i>rseA</i>	Regulador de Chaperonas
Control de la traducción	<i>rpmJ</i>	Control de la traducción
	<i>rpsF</i>	Control de la traducción
	<i>dksA</i>	Control de la traducción
	<i>smpB</i>	Control de la traducción
División Celular	<i>xerC</i>	Relacionado a la división celular
	<i>dedD</i>	Relacionado a la división celular
	<i>envC</i>	Relacionado a la división celular
Transportadores	<i>zntA</i>	Transportadores de membrana
	<i>ybgH</i>	Transportadores de membrana
	<i>cydD</i>	Transportadores de membrana
	<i>nhaA</i>	Transportadores de membrana
	<i>yjiY</i>	Proteína putativa de la membrana interna
Otros	<i>yaiS</i>	Desacetilasa no caracterizada
	<i>ydgH</i>	Proteína ydgH

Anexo 2. Porcentajes de similitud entre MAGs y genomas de referencia pertenecientes a la clase Tepidiformia.

Clase Tepidiformia	Tepidiforma bonchosmolovskayae	MAG 122-VP-T O2	MA G38-VP-T O-1	MA G8-R C1	MAG 53-L uz	MA G85-M	MAG 56-H
Tepidiforma bonchosmolovskayae	100	79.44	79.94	80.29	80.29	80.15	98.64
MAG122-VP-T O2		100	99.35	88.93	86.78	86.98	78.6
MAG38-VP-T O-1			100	91.31	88.29	88.57	80.14
MAG8-RC1				100	92.17	92.16	80.23
MAG53-Luz					100	93.77	80.44
MAG85-M						100	80.44
MAG56-H							100

Anexo 3. Porcentajes de similitud entre MAGs y genomas de referencia pertenecientes a la clase Caldilineae.

Clase Caldilinea	Caldilinea aerophila DSM14535	Caldilinea aerophila 193	Caldilinea aerophila 289	MA G66-VP-T O1	MAG 4-VP -TO4	MA G5-V P-TO -1	MA G13-Luz	MAG 1-RC 1
Caldilinea aerophila DSM14535	100	95.58	95.59	66.88	66.51	84.81	84.68	84.62
Caldilinea aerophila 193		100	99.68	66.91	66.26	84.89	84.79	84.61
Caldilinea aerophila 289			100	66.53	66.27	84.97	84.75	84.62
MAG66-VP-T O1				100	99.84	65.86	67.6	67.35
MAG4-VP-T O4					100	67.1	66.55	66.27
MAG5-VP-T O-1						100	96.97	97.11
MAG13-Luz							100	98.21
MAG1-RC1								100

Anexo 4. Porcentajes de similitud entre MAGs y genomas de referencia pertenecientes a la clase Ktedonobacteria.

Clase Ktedonobacteria	Ktedonobacter racemifer DSM44963	MAG78-H
Ktedonobacter racemifer DSM44963	100	65.35
MAG78-H		100

Anexo 5. Porcentajes de similitud entre MAGs y genomas de referencia pertenecientes a la clase Thermoflexia.

Clase Thermoflexia	Thermoflexus hugenholtzii JAD2	Thermoflexus hugenholtzii G233	MA G27-VP-T O4	MA G1-L	MAG 2-L	MA G29-H	MAG 102-VP-FC	MA G80-M	MA G26-RC1	MAG 3-Luz	MA G65-VP-T O1
Thermoflexus hugenholtzii JAD2	100	64.46	64.04	63.78	98.24	63.6	63.75	64.58	64.05	63.95	64.23
Thermoflexus hugenholtzii G233		100	67.61	67.59	89.19	65.93	65.38	65.98	65.69	65.7	65.46
MAG27-VP-TO4			100	67.91	67.58	67.37	66.17	66.5	66.12	66.39	66.24
MAG1-L				100	67.18	65.77	64.68	65.32	65.47	66.49	65.08
MAG2-L					100	65.94	65.03	65.71	65.57	65.58	65.23
MAG29-H						100	66.36	67.04	66.37	66.96	66.67
MAG102-VP-FC							100	76.36	71.78	70.4	70.52
MAG80-M								100	74.53	71.44	71.15
MAG26-RC1									100	70.87	70.31
MAG3-Luz										100	96.48
MAG65-VP-TO1											100

Anexo 7. Porcentajes de similitud entre MAGs y genomas de referencia pertenecientes a la clase Chloroflexi.

Clase Chloroflexi	Roseiflexus castenholzii DSM13941	Chloroflexus aggregans DSM94895	Chloroflexus sp. Y-396-1	Chloroflexus sp. MS-G	Chloroflexus aurantiacus J-10-fl	Chloroflexus aurantiacus Y-40-fl	Chloroflexus aurantiacus UBA8861	Chloroflexus islandicus	MAG15-VP-BT	MAG26-S	MAG4-VP-T O-1	MAG14-Luz	MAG80-VP-T O4	MAG23-RC1	MAG55-VP-T O1	MAG42-VP-T O4	MAG10-S
Roseiflexus castenholzii DSM13941	100	68.9	66.87	66.76	67.32	67.5	67.42	68.24	69.19	78.98	78.96	79.01	67.41	67.89	67.21	67.09	67.39
Chloroflexus aggregans DSM94895		100	74.07	74.12	74.82	74.87	74.88	78.27	66.29	67.09	67.28	66.99	68.44	74.57	74.74	74.76	74.56
Chloroflexus sp. Y-396-1			100	91.2	76.49	76.5	76.48	74.85	65.91	66.82	66.95	66.83	67.73	76.39	76.34	76.29	76.2
Chloroflexus sp. MS-G				100	76.54	76.61	76.54	74.9	65.92	66.85	66.98	66.91	67.76	76.51	76.41	76.36	76.24
Chloroflexus aurantiacus J-10-fl					100	99.99	99.97	76.08	66.61	67.75	67.68	67.61	68.8	95.22	93.29	93.29	93.4
Chloroflexus aurantiacus Y-40-fl						100	99.97	76.14	66.55	67.84	67.78	67.76	68.85	95.27	93.27	93.25	93.37
Chloroflexus aurantiacus UBA8861							100	76.04	67.4	67.8	67.6	67.84	68.72	95.31	93.28	93.27	99.33
Chloroflexus islandicus								100	66.54	67.73	67.77	67.83	70	76	75.93	75.92	75.8
MAG15-VP-BT									100	69	68.99	69.01	67.77	66.47	66.44	66.58	66.38
MAG26-S										100	98.79	98.41	67.42	71.9	67.41	67.6	67.5
MAG4-VP-T O-1											100	99.04	67.41	71.81	67.44	67.39	68.12

MAG14-Luz												100	67.41	70.87	67.42	67.46	68.22
MAG80-VP-TO4													100	68.52	68.45	68.39	68.57
MAG23-RC1														100	94.48	94.53	94.75
MAG55-VP-TO1															100	99.93	97.03
MAG42-VP-TO4																100	97.02
MAG10-S																	100