

شناسایی پتانسیل‌های زیستی چشمه آب گرم قوتورسویی به عنوان اسیدی‌ترین چشمه آب گرم ایران: بررسی پروفایل باکتریایی و آرکیایی و مکانیسم‌های سازگاری

Identification of biological potentials of Ghotoursooyi hot spring as the most acidic hot spring of Iran: profiling of bacterial and archaeal communities and adaptation mechanisms

رضا آذربایجانی^۱، محمدرضا نقوی^{۱*}، قاسم حسینی سالکده^۲، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی^۳، احمد علی پوربابایی^۴، لاله پارسا یگانه^۵

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- استاد، گروه زیست شناسی سامانه ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

۳- دانشیار، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۴- دانشیار، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵- مربی پژوهشی، بانک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

Azarbajani R¹, Naghavi MR^{*1}, Hosseini Salekdeh Gh², Shahzadeh Fazeli SA³, Pourbabaee AA⁴, Parsa Yeganeh L⁵

1- PhD Student of Agricultural Biotechnology, Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, College Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

3- Associate Professor, Human and animal cells bank, Iranian Biological Resource Center, ACECR, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of soil science, College Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5- Research Associate, Molecular bank, Iranian Biological Resource Center, ACECR, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mnaghavi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳)

چکیده

چشمه‌های آب گرم جمعیت میکروارگانیسم‌های متنوعی را که حائز اهمیت تجاری و علمی برای محققان و صنایع زیست فناوری فعال در حوزه آنزیم‌ها، قندها، املاح سازگار و آنتی بیوتیک‌ها هستند، برخوردار می‌باشند. تجزیه و تحلیل تنوع زیستی در چنین محیط‌های با شرایط زیستی سخت سبب ایجاد اکولوژی متنوع و منحصر به فرد و به دلیل ایجاد فرصت برای شناسایی ترکیبات و ژن‌های نادر و سایر خصوصیات زیستی دیگر کاملاً مورد توجه قرار گرفته است. چشمه‌های آب گرم در مجاورت محیط‌های آتشفشانی اغلب اسیدی هستند و pH در مناطق نزدیک به سنگ آهک کمی قلیایی است. اگر چه مطالعات متعددی روی میکروبیوم این زیست‌بوم‌ها در سال‌های اخیر در دنیا صورت گرفته است اما تاکنون مطالعات کمی روی چنین محیط‌های اکستریم بومی ایران انجام گرفته است. کشور ایران دارای مناطق ژئوترمال و آتشفشانی مختلف بوده و چشمه‌های آب گرم متعدد و منحصر به فرد دارای خصوصیات ضد میکربی و ضد قارچی، ضد روماتیسم و سایر دردهای عضلانی را در خود جای داده است. در بین ساکنان و مردم این باور عمومی وجود دارد که آب بعضی از چشمه‌های آب گرم دارای خواص درمانی در برابر بیماری‌های مختلف پوستی است که می‌تواند متأثر از خواص فیزیوشیمیایی و یا ویژگی‌های میکروبیولوژیک آن‌ها باشد. از سوی دیگر مطالعات وابسته به کشت برای جداسازی ارگانیسم‌های جدید و کاوش در دارایی‌های آن‌ها ارزشمند است، اما روش‌های مستقل از کشت ارزیابی جامع‌تری از تنوع میکروبی را ارائه می‌دهند. در این مطالعه شناسایی ترکیب و تعیین فراوانی تاکسون‌های مختلف جامعه باکتریایی و آرکیایی چشمه آب گرم قوتورسویی به عنوان یکی از اسیدی‌ترین چشمه‌های آب گرم جهان با روش‌های مستقل از کشت و با استفاده از تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی انجام شد. جهت پروفایلینگ کمی جوامع باکتریایی و آرکیایی مربوطه، به ترتیب ساخت کتابخانه‌های ژن 16S rRNA از دو ناحیه عملکردی طبقه‌بندی تاکسونومیک V4 تا V5 و V3 تا V4 با آغازگرهای بارکد شده صورت پذیرفت. با آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها با سامانه‌های MG-RAST، تعداد ۲۶ تاکسون مختلف مربوط به خانواده‌ها و جنس‌های مختلف باکتریایی و ۱۱ تاکسون مختلف مربوط به خانواده‌ها و جنس‌های مختلف آرکیایی مورد شناسایی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی

چشمه آب گرم قوتورسویی

زیست‌بوم اکستریم

متاژنومیکس

میکروبیوم

مقدمه

زیست بوم باکتریایی چشمه های آب گرم نقش مهمی در متابولیسم انرژی و چرخه مواد ایفا می کنند (Cai et al. 2013). تلاش های مداومی جهت شناسایی و رمزگشایی نقش اکولوژیک جامعه میکروبی چشمه های آب گرم صورت گرفته است (Blank et al. 2002; Hou et al. 2013; Lio et al. 2016). علی رغم مطالعات متعدد انجام شده تاکنون، به دلیل تفاوت اکوسیستم های مختلف چشمه های آب گرم، هنوز ناشناخته های بسیاری در زمینه جوامع میکروبی این چشمه ها، روابط زیستی و سازگاری گونه های مختلف باکتریایی نسبت به زیست در شرایط فوق سخت وجود دارد (Lau et al. 2009). اکثر مطالعات صورت گرفته متمرکز بر نقاط ظهور پرتعداد چشمه های آب گرم در کوهپایه های رشته کوه ها یا قله های آتشفشانی فعال یا خاموش بوده است (Bohorquez et al. 2012; Hedlund et al. 2015; Kumar et al. 2014; Liu et al. 2016). در ایران نیز نقاط متعدد و چشمه های آب گرم متنوعی در دامنه رشته کوه های البرز و زاگرس وجود دارند که ۶۶ چشمه آب گرم شناسایی شده روستایی نقش مهمی در گردشگری سلامت ایفا می کنند. علی رغم وجود این تعداد آب گرم در کشور مطالعات جامعی در ارتباط با شناسایی ظرفیت ژنتیکی و زیستی و میکروبی این چشمه ها صورت نگرفته است (Golshiri et al. 2015). عمده تحقیقات انجام شده در ایران بر شناسایی آنزیم های گرمادوست و یا جداسازی باکتری های کشت پذیر این چشمه تمرکز داشته است (Farahmand et al. 2009; Heidari et al. 2018; Nourmohammadi et al. 2013). در این تحقیق با استفاده از روش های مستقل از کشت که بر پایه تکنیک های نسل جدید توالی یابی استوار است جامعه میکروبی و سایر خصوصیات بیولوژیک و فیزیوشیمیایی چشمه آب گرم قوتورسویی به عنوان اسیدی ترین چشمه آب گرم ایران و یکی از اسیدی ترین چشمه ها در دنیا مورد مطالعه و کاوش دقیق تر قرار گرفت.

مواد و روش ها

چشمه داغ اسیدی قوتورسویی (طول جغرافیایی: ۴۷/۸۵۹۸۷ - عرض جغرافیایی: ۳۸/۳۳۷۶) در جنوب مشکین شهر در استان

اردبیل در شمال غربی ایران در دامنه کوه آتشفشانی سبلان واقع شده است. میزان جریان این چشمه ۱۳ لیتر در ثانیه است و برای رفع بیماری های پوستی به خوبی شناخته شده است (شکل ۱). به منظور جداسازی میکروارگانیسم ها و استخراج DNA آن ها، ۳۰ لیتر آب این چشمه با استفاده از پمپ وکیوم و واحد فیلتراسیون تحت خلاء یکبار مصرف ۰/۲ میکرومتر (Sartolab® 150V, PES) (Cat No.:18080-M, Sartorius Stedim Co. Germany) جمع آوری و به منظور حذف تاثیر تفاوت دمایی در اثر انتقال آب در محل چشمه فیلتر شد (شکل ۲).

اندازه گیری پارامترهای فیزیوشیمیایی آب از جمله دما، pH و سختی آب (TDS) در زمان نمونه برداری در محل چشمه آب گرم با استفاده از pH متر قابل حمل طبق روش کار مربوطه صورت گرفت (Prieto-Barajas et al. 2017).

DNA ژنومی کل با شستشوی فیلتر ۰/۲ میکرومتری جدا شده و با استفاده از پروتکل اصلاح شده سیداپورا مورد استخراج قرار گرفت (Siddhapura et al. 2010). به منظور دستیابی به میکروبیوم فیلتر شده، و به جهت حل کردن باکتری ها و آرکی های جدا شده، قطعات فیلتر در شرایط استریل به قطعات کوچکتر خرد شده و در ۱۵ میلی لیتر بافر سوسپانسیون به مدت یک شبانه روز (100 mM Tris-HCl (pH 8.2); 100 mM EDTA (pH 8); 1.5 M NaCl در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه مورد تیمار قرار گرفتند. سوسپانسیون میکروبی جهت تغلیظ و رسوب گیری با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به منظور تخریب فیزیکی و به دلیل ترکیب متنوع جنس های مختلف باکتریایی و آرکیایی در سوسپانسیون میکروبی و با هدف تاثیر مناسب تر هضم شیمیایی، ترکیبی از شدیدترین تیمار فیزیکی شامل یخ و ذوب متناوب در ازت مایع و دمای ۶۵ درجه همراه با برهم زدن شدید توام با ذرات شیشه روی رسوب سانتریفیوژ شده سوسپانسیون صورت گرفت. جهت هضم شیمیایی، محصول اولیه حاصل از تیمار فیزیکی با پنج میلی لیتر از بافر هضم کننده شیمیایی متشکل از ترکیب (20%, w/v) SDS; Lysozyme 20 mg/ml; ProtinaseK10 mg/ml; N-lauroyl sarcosine 10 mg/ml; 1% CTAB (w/v) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در بن ماری مورد تیمار قرار گرفتند. غلظت DNA دو رشته ای در

ثانیه و دمای اتصال ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیری ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه می‌باشند.

توالی‌یابی کتابخانه ژن 16S rRNA با پلتفرم FLX 454 titanium که توانایی خوانش قطعات بزرگ تا ۵۰۰ باز را دارا می‌باشد صورت گرفت. مبنای فناوری این نوع توالی‌یابی بر اساس emPCR و pyrosequencing می‌باشد. آنالیز داده‌های انبوه حاصل از توالی‌یابی با پایپلاین SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs>) صورت گرفت. فرایند آنالیز داده‌های خام توسط این پایپلاین به وسیله پنج ماژول بنیادی صورت گرفت. مراحل مختلف فرایند آنالیز شامل هم‌ردیف سازی (align)، کنترل کیفی (quality control)، تقلیل توالی‌ها (dereplication)، خوشه‌سازی (clustering) و طبقه‌بندی (classification) می‌باشد. داده‌های ورودی این پایپلاین بر اساس فرمت multi fasta می‌باشد. در هم‌ردیف‌سازی (کنترل کیفی اولیه) تمامی خوانش‌های ورودی جهت تشخیص و حذف خوانش‌های دارای نقص یا مشکل (مانند قطعات کاذب PCR) توسط ماژول SINA (http://www.arb-silva.de/aligner/sina_download/) مورد بررسی قرار گرفته و توالی‌های نامناسب در مراحل بعدی آنالیز قرار نمی‌گیرند. در مرحله تقلیل توالی‌ها و خوشه‌سازی، به منظور کاهش زمان و امکان‌پذیری نرم‌افزاری انجام آنالیز، تمامی خوانش‌های کنترل کیفی شده موفق در حالت تشابه صددرصدی در قالب خوشه‌های دسته‌بندی شده قرار می‌گیرند. در نهایت بلندترین خوانش از هر خوشه با ابزار Blast و بر اساس پایگاه داده‌های SILVA مورد طبقه‌بندی تاکسونومیک قرار می‌گیرند.

محصول استخراجی با استفاده از کیت سنجش dsDNA Quant-iT dsDNA و فلورومتر Qubit (Invitrogen, USA) تعیین شد.

در مورد DNA متاژنومی استخراج شده از یک محیط میکروبی ساخت کتابخانه ژن 16S ریبوزومی با تکثیر قطعات این ژن از همه باکتری‌ها با استفاده از آغازگرهای عمومی امکان‌پذیر است. تکثیر این توالی از طریق آغازگرهای ابتدا و انتهای توالی می‌باشد که به لحاظ بیولوژیک باید علاوه بر تکثیر اختصاصی ژن 16S ریبوزومی توانایی تکثیر این ژن در همه باکتری‌ها و آرکی‌ها را داشته باشند. این آغازگرها شامل، آغازگر مستقیم 27F و آغازگر معکوس 534R می‌باشند که ناحیه V1 تا V3 را از این ژن پوشش می‌دهند (جدول ۱).

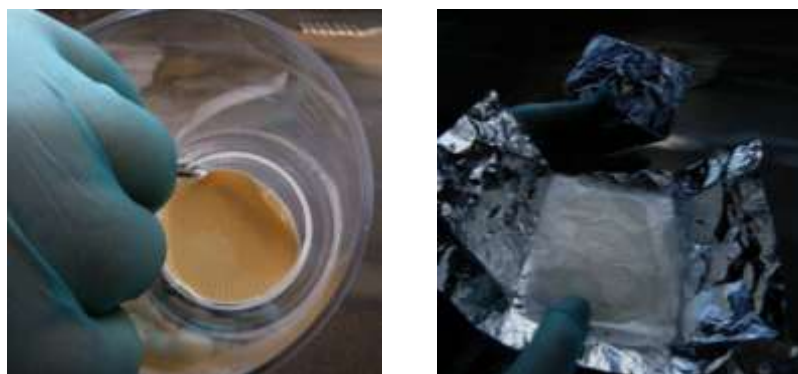
همچنین روی آغازگرهای متاژنومی، توالی خاصی برای استفاده در فرایند توالی‌یابی NGS که مکمل یک رشته دیگر بر روی ذره یا واحدهای توالی‌یابی می‌باشد قرار می‌گیرند که اصطلاحاً Lib و یا آداپتور گفته می‌شوند. توالی‌های Lib در هر دو آغازگر مستقیم و معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرند و در واقع این توالی‌ها به عنوان آغازگر توالی‌یابی استفاده می‌گردند و به آن‌ها پرایمر امتزاجی (Fusion Primers) نیز گفته می‌شود. این قطعات توالی مخصوص توالی‌یابی برای آغازگر مستقیم شامل 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-3' و آغازگر معکوس 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-3' می‌باشد. برنامه تکثیری این آغازگرها جهت انجام واکنش مربوطه مشتمل بر یک چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه از دمای ۹۵ درجه واسرشت‌سازی به مدت ۲۰

جدول ۱- مشخصات توالی و تکثیری پرایمرهای مورد استفاده جهت ساخت کتابخانه

Amplification organisms	Target variable region	Primer name	Sequence (5' to 3')
Bacterial	V4-V5	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
		926R	CCGYCAATTYMTTTRAGTTT
Archaeal	V3-V4	349F	GYGCASCAGKCGMGAAW
		785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC



شکل ۱- محدوده جغرافیایی مکان نمونه گیری از چشمه آب گرم قوتورسویی در دامنه کوه سبلان، استان اردبیل



شکل ۲- جداسازی میکروبیوم آب چشمه قوتورسویی در محل نمونه برداری با سیستم فیلتراسیون خلاء

نتایج و بحث

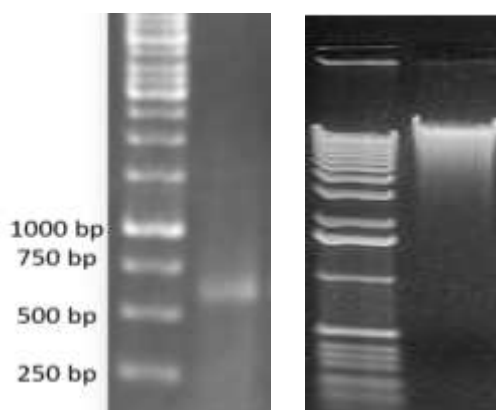
بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه چشمه آبگرم قوتورسویی نشان داد که این چشمه با درجه اسیدیته ۲/۸۷ و با میزان بالای یون کلراید اسیدی ترین چشمه کلرایدی ایران به شمار می رود. ترکیبات شیمیایی و خصوصیات فیزیکی دیگر آب این چشمه در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و ترکیبات شیمیایی چشمه آبگرم قوتورسویی

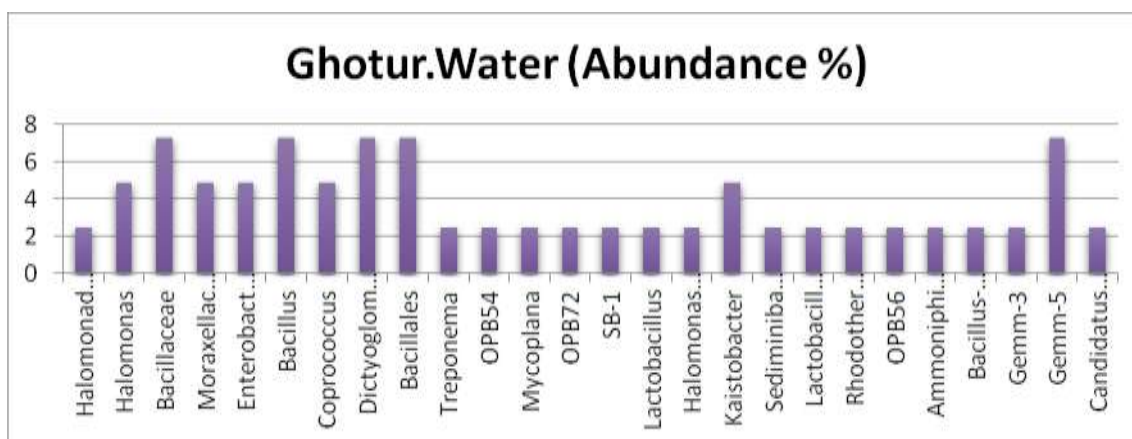
پارامتر فیزیکوشیمیایی	چشمه آبگرم قوتورسویی
pH	2.87
Temp.	37.9 °C
TDS	1771 (mg/L)
Cl	26500 (mg/L)
SO4	620 (mg/L)
As	0.02 (mg/L)
Na	139.6 (mg/L)
K	29.3 (mg/L)
Ca	23.7 (mg/L)

غلظت و کیفیت DNA متاژنومی استخراج شده در قابلیت تکثیر بهینه و ساخت کتابخانه ژن 16S rRNA بسیار حائز اهمیت است. محلول DNA استخراج شده این چشمه که با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و خاصیت جذب نوری صورت گرفت دارای غلظت ۷۷/۵ ng/μL و نسبت کیفی جذب A260/A280 معادل عدد ۲/۰۰۶ اندازه گیری شد. بعد از تکثیر PCR در دستگاه با روش و پروتکل مذکور، جهت تأیید انجام موفق PCR و ساخت کتابخانه ژن 16S، ۳μl از محصول روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل ۳ الف و ب).

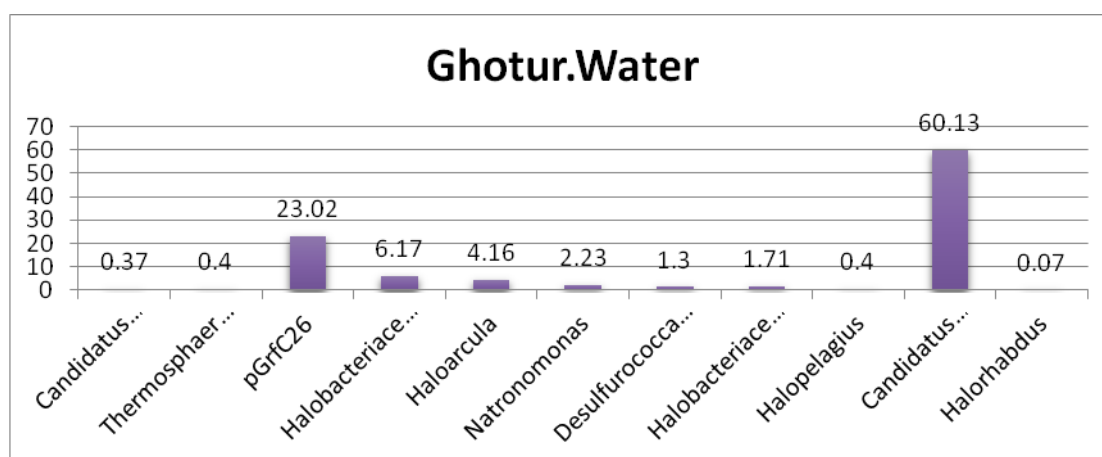
در ۲۶ تاکسون شناسایی شده در جامعه باکتریایی چشمه آبگرم قوتورسویی، ۱۰ تاکسون غالبیت نسبی در فراوانی محاسبه شده برای این محیط دارند که نشان دهنده تنوع متوازن در ترکیب و فراوانی جامعه باکتریایی این محیط دارد (شکل ۴).



شکل ۳- الکتروفورز الف) DNA متاژنومیک استخراج شده و ب) کتابخانه تکثیری ژن 16S rRNA باکتریایی



شکل ۴- نمودار ترکیب و فراوانی جامعه باکتریایی چشمه آبگرم قوتورسویی



شکل ۵- نمودار ترکیب و فراوانی جامعه آرکیایی چشمه آبگرم قوتورسویی

به ترتیب بیشتر از ۶۰ و ۲۳ درصد این جامعه را تشکیل می دهد (شکل ۵).

در شبکه همبستگی عملکردی سلسله مراتبی (hierarchical) جوامع باکتریایی در نمونه آب چشمه قوتورسویی *Lactobacillus* و *Sediminibacterium* کمترین و تاکسون های *Moraxelaceae*

در ۱۱ تاکسون شناسایی شده در جامعه آرکیایی چشمه آبگرم قوتورسویی، ۴ تاکسون غالبیت بیشتری در فراوانی محاسبه شده برای این محیط دارند که تاکسون های *Candidatus Nitrosocaldus* و *pGrfC26* تاکسون های غالب می باشند که

تحلیل و ارزیابی قرار گرفتند. اسیدوفیل های شدید قادر به رشد در مقادیر pH نزدیک به صفر هستند. ماندگاری در محیط های اسیدی نیاز به سازگاری گسترده ای از غشاها، پمپ های پروتون و مکانیسم های ترمیم DNA دارد (Vinokur et al. 2016). اولین خط دفاع در برابر اسیدیته در بعضی از آرکی های گرمادوست تک لایه چربی ساخته شده از چربی های تترا اتر C40 می باشد که بسیار غیر قابل نفوذ است (Stern et al. 1992). لیپید های مبتنی بر ایزوپروپونوئید بسته بندی محکم تری ایجاد می کنند و باعث می شوند نفوذ پذیری غشای آرکی ها نسبت به مولکول های کوچک و پیوندهای اتر و ثبات اسیدی محیط کمتر شود (Jacquemet et al. 2009).

همچنین یک ویژگی بسیار جالب ترپینوئیدها کاربرد اقتصادی و اهمیت پزشکی آنها در بهبود پوسته پوسته شدن پوست، کاهش تورم و خارش و سایر موارد است که با کاربرد و تأثیر معروف آب این چشمه در رفع ناراحتی های پوستی کاملاً سازگار است (Chai et al. 2017).

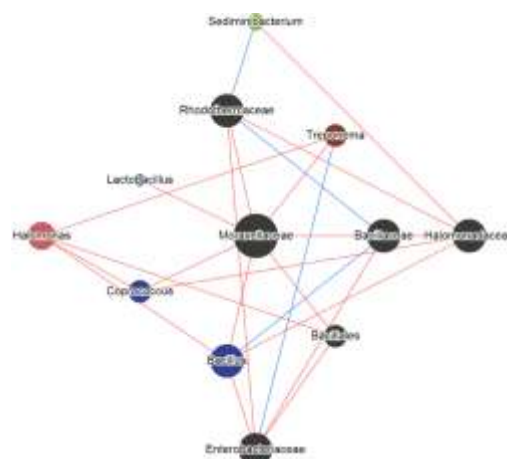
پیش ماده ۵ کربنی برای همه ایزوپروپونوئیدها، ایزوپنتیل پیروفسفات (IPP) است که توسط مسیر متابولیکی میوالونات در یوکاریوت ها، آرکی ها و برخی باکتری ها تولید می شود (Holstein and Hohl 2004).

با این حال، در بیشتر آرکی ها، میوالونات یک بار فسفریله می شود تا ۵-فسفات میوالونات (M5P) ایجاد شود، سپس به ایزوپنتیل فسفات (IP) دکربوکسیله شده و در نهایت دوباره برای تولید IPP فسفریله می شود (Dellas et al. 2013 and VanNice et al. 2014). یکی از آنزیم های کلیدی در این زمینه آنزیم فسفو میوالونات دکربوکسیلاز (EC: 4.1.1.99) می باشد که در آرکی گرمادوست *Haloferax volcanii* شناسایی شده است (VanNice et al. 2014).

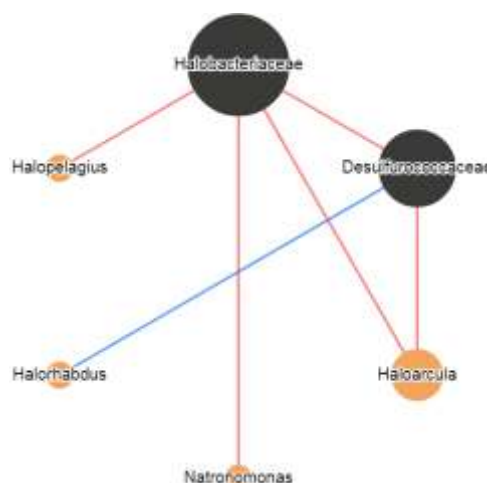
بررسی پروفایل آنزیمی آرکی های محیط آب چشمه قوتورسویی در مورد مسیر متابولیکی Terpenoid backbone biosynthesis نشان دهنده پتانسیل آرکی های چشمه قوتورسویی در این زمینه می باشد و غنای آنزیم کلیدی فسفو میوالونات دکربوکسیلاز (EC: 4.1.1.99) نیز در چشمه قوتورسویی به مراتب بیشتر است.

Enterobacteriaceae بیشترین مشارکت عملکردی را دارند (شکل ۶).

در شبکه همبستگی دایره ای اعضای جامعه آرکیایی آب چشمه قوتورسویی مشاهده می شود که تاکسون *Halobacteriaceae* نقش محوری دارد و با تاکسون *Desulfurococcaceae* و *Haloarcula* ارتباط عملکردی متقابل دارند (شکل ۷).



شکل ۶- شبکه همبستگی عملکردی جوامع باکتریایی نمونه آب چشمه قوتورسویی



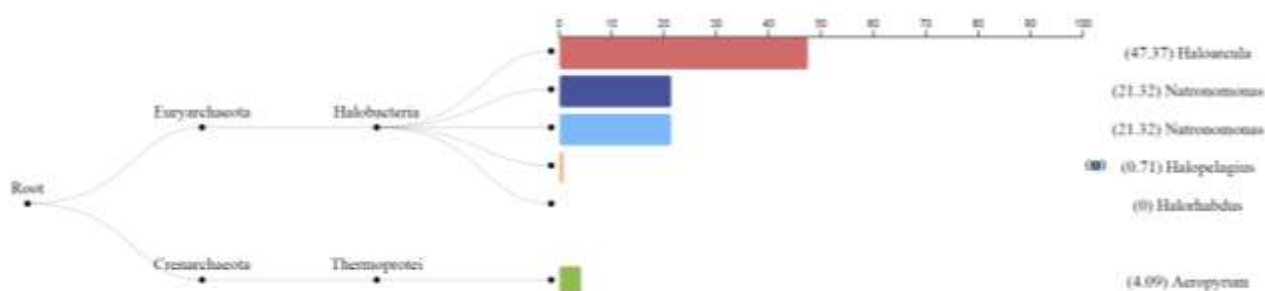
شکل ۷- شبکه همبستگی عملکردی جامعه آرکیایی نمونه آب چشمه قوتورسویی

به منظور بررسی سازگاری فیزیولوژیک زیست در شرایط اسیدی، پروفایل آنزیمی، مشارکت کمی و عملکردی تاکسون ها و پوشش مسیر متابولیکی Terpenoid backbone biosynthesis مورد

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی طرح تحقیقاتی مربوطه (کد طرح: Mo-1393-029) در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام شد. از همکاری همکاران این مرکز و بانک مولکولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

همچنین در دندروبار ذیل مشارکت عملکردی تاکسون‌های مختلف آرکیایی نمونه آب چشمه قوتورسویی به صورت کمی نشان داده شده است. در محیط قوتورسویی که این مسیر متابولیکی جزئی از استراتژی سازگاری آرکی‌های این محیط است جنس *Haloarcula* با ۴۷/۳۷ درصد بیشترین نقش را ایفا می‌کند (شکل ۸).



شکل ۸- دندروبارهای مشارکت عملکردی تاکسون‌های مختلف آرکیایی نمونه آب چشمه قوتورسویی در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها به صورت کمی

منابع

Blank CE, Cady SL, Pace NR (2002) Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5123-35.

Bohorquez LC, Delgado-Serrano L, López G, Osorio-Forero C, Klepac-Ceraj V, Kolter R, Junca H, Baena S, Zambrano MM (2012) In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. *Microbial ecology* 63:103-15.

Cai L, Ye L, Tong AH, Lok S, Zhang T (2013) Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PloS one* 14:8:e53649.

Chai J, Wang D, Peng Y, Zhao X, Zhang Q, Li P, Fang X, Wang M, Cai X (2017) Molecular cloning, expression and immunolocalization analysis of diphosphomevalonate decarboxylase involved in terpenoid biosynthesis from *Euphorbia helioscopia* L. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 31:1106-1115.

Dellas N, Thomas ST, Manning G, Noel JP (2013) Discovery of a metabolic alternative to the classical mevalonate pathway *eLife* 2:e00672.

Farahmand M, MozaffariNoor A, Mehrabian S, Khavarinejad R (2009) Investigation of the properties of alpha amylase produced by thermophilic bacteria isolated

from Iranian hot springs. *Journal of Pajouhesh & Sazandegi*. 4:161-167 (In Farsi).

Golshiri Z, Roknodin eftekhar A, Pourtaheri M (2015) Modeling of Health Tourism Development in Rural Areas of Iran (Hot Springs). *Tourism Planning and Development* 3:11-22 (In Farsi).

Hedlund BP, Reysenbach AL, Huang L, Ong JC, Liu Z, Dodsworth JA, Ahmed R, Williams AJ, Briggs BR, Liu Y, Hou W (2015) Isolation of diverse members of the Aquificales from geothermal springs in Tengchong, China *Frontiers in microbiology* 6:157.

Heydari F, Riahi H, Yousefzadi M, Shariatmadari Z (2013) Morphological and phylogenetic diversity of cyanobacteria in four hot springs of Iran. *The Iranian Journal of Botany* 19:162-172 (In Farsi).

Holstein SA, Hohl RJ (2004) Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids* 39: 293-309.

Hou W, Wang S, Dong H, Jiang H, Briggs BR, Peacock JP, Huang Q, Huang L, Wu G, Zhi X, Li W (2013) A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing. *PloS one* 8:e53350.

Jacquemet A, Barbeau J, Lemiègre L, Benvegnu T (2009) Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications *Biochimie* 91:711-717.

- Kristjánsson JK, Hjörleifsdóttir S, Marteinsson VT, Alfredsson GA (1994) *Thermus scotoductus*, sp. nov., a pigment-producing thermophilic bacterium from hot tap water in Iceland and including *Thermus* sp. X-1. *Systematic and applied microbiology* 17:44-50.
- Kumar M, Yadav AN, Tiwari R, Prasanna R, Saxena AK (2014) Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs. *Annals of microbiology* 64:741-51.
- Lau Lau MC, Aitchison JC, Pointing SB (2009) Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles* 13:139-49.
- Liu L, Salam N, Jiao JY, Jiang HC, Zhou EM, Yin YR, Ming H, Li WJ (2016) Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. *Microbial ecology* 72:150-62.
- Nourmohammadi E, Farahmand M, Esmaeili Rastaghi AR (2018) Identification of extremophiles producing anti-cancer enzymes L-glutaminase and L-asparaginase from Larijan hot spring. *New Cellular & Molecular Biotechnology* 8:29-38 (In Farsi).
- Prieto-Barajas CM, Alfaro-Cuevas R, Valencia-Cantero E, Santoyo G (2017) Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88:616-24.
- Schröder C, Blank S, Antranikian G (2015) First glycoside hydrolase family 2 enzymes from *Thermus antranikianii* and *Thermus brockianus* with β -glucosidase activity. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3:76.
- Siddhapura PK, Vanparia S, Purohit MK, Singh SP (2010) Comparative studies on the extraction of metagenomic DNA from the saline habitats of Coastal Gujarat and Sambhar Lake, Rajasthan (India) in prospect of molecular diversity and search for novel biocatalysts. *International journal of biological macromolecules* 47:375-9.
- Stern J, Freisleben HJ, Janku S, Ring K (1992) Black lipid membranes of tetraether lipids from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab* 1128:227-236.
- Tang K, Kobayashi RS, Champreda V, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S (2008) Isolation and characterization of a novel thermostable neopullulanase-like enzyme from a hot spring in Thailand. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72:1448-56.
- Tekere M, Lötter A, Olivier J, Jonker N, Venter S (2011) Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *African Journal of Biotechnology* 10:18005-12.
- Tirawongsaroj P, Sriprang R, Harnpicharnchai P, Thongaram T, Champreda V, Tanapongpipat S, Pootanakit K, Eurwilaichitr L (2008) Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology* 133:42-9.
- VanNice JC, Skaff DA, Keightley A, Addo JK, Wyckoff GJ, Mizioro HM (2014) Identification in *Haloferax volcanii* of phosphomevalonate decarboxylase and isopentenyl phosphate kinase as catalysts of the terminal enzyme reactions in an archaeal alternate mevalonate pathway. *Journal of bacteriology* 196:1055-1063.
- Vinokur J M, Cummins MC, Korman TP, Bowie JU (2016) An adaptation to life in acid through a novel mevalonate pathway. *Scientific reports* 6:1-11.
- Zarafeta D, Kissas D, Sayer C, Gudbergdottir SR, Ladoukakis E, Isupov MN, Chatziioannou A, Peng X, Littlechild JA, Skretas G, Kolisis FN (2016) Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. *PLoS One* 11:e0146454.
- Zhao C, Chu Y, Li Y, Yang C, Chen Y, Wang X, Liu B (2017) High-throughput pyrosequencing used for the discovery of a novel cellulase from a thermophilic cellulose-degrading microbial consortium. *Biotechnology letters* 39:123-31.