فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۹ ص. ۲۶-۱۹

مقاله پژوهشی

بررسی تنوع و فراوانی جمعیت باکتریایی چشمه آبگرم قینرجه: شناسایی اکوسیستم میکروبی داغ‌ترین چشمه آبگرم ایران با روش‌های مستقل از کشت و بر پایه توالی‌یابی نسل جدید

رضا آذربایجانی[۱]، لاله پارسا یگانه[۱] *

[۱] بانک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

* Email: la_yeganeh@yahoo.com

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

چکیده

زیست بوم‌های اکستریم چشمه‌های آبگرم آنها یک منبع بیولوژیکی مهم برای شناسایی ذخایر ژنتیکی میکروارگانیسم‌های گرمادوست و ویژگی‌های بیولوژیکی آنها از نظر تحمل و بقا در دماهای بالا و استفاده از این پتانسیل درصنایع مختلف و بیوتکنولوژی هستند. اگر چه مطالعات متعددی بر روی میکروبیوم این زیست بومها در سال‌های اخیر در دنیا صورت گرفته است اما تا کنون مطالعات کمی بر روی چنین محیطهای اکستریم بومی ایران انجام گرفته است. کشور ایران دارای مناطق ژئوترمال و آتشفشانی مختلف بوده و چشمه‌های آبگرم متعدد و منحصر به فرد دارای خصوصیات ضدمیکربی و ضدقارچی، ضد روماتیسم و سایر دردهای عضلانی را در خود جای داده است. در این مطالعه شناسایی ترکیب و تعیین فراوانی تاکسون‌های مختلف جامعه باکتریایی چشمه آبگرم قینرجه به عنوان یکی از داغترین چشمه‌های کلرایدی جهان با روش‌های مستقل از کشت و با استفاده از تکنیک‌های نسل جدید توالی یابی انجام گردید.جهت پروفایلینگ کمی جامعه باکتریایی مربوطه و یا اصطلاحا آنالیز متاژنومیکس، ساخت کتابخانه‌های ژن 16s rRNA از سه ناحیه عملکردی طبقه‌بندی تاکسونومیک V1 تا V3 و با آغازگرهای بارکد شده صورت پذیرفت. با آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها با سامانه‌های MG-RAST و SILVAngs، تعداد ۲۰۰ تاکسون مختلف مربوط به خانواده ها و جنس‌های مختلف باکتریایی مورد شناسایی قرار گرفتند. تاکسون‌های غالب به ترتیب ازبیشترین فروانی شامل *Pediococcus acidilactici*، uncultured (unclassified) bacterium، *Lactobacillus rhamnosus*، *Thermus scotoductus*، *Thermus sp. HR13* و *Thermus sp. BXR* می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: زیست بوم اکستریم، چشمه آبگرم قینرجه، متاژنومیکس، میکروبیوم.

مقدمه

زیست بوم باکتریایی چشمه‌های آبگرم نقش مهمی در متابولیسم انرژی و چرخه مواد ایفا می‌کنند [۷]. تلاش‌های مداومی جهت شناسایی و رمزگشایی نقش اکولوژیک جامعه میکروبی چشمه‌های آبگرم صورت گرفته است [۱۴ و ۹، ۵]. علیرغم مطالعات متعدد انجام شده تا کنون، به دلیل تفاوت اکوسیستم‌های مختلف چشمه‌های آبگرم، هنوز ناشناخته‌های بسیاری در زمینه جوامع میکروبی این چشمه‌ها، روابط زیستی این‌ها و سازگاری گونه‌های مختلف باکتریایی نسبت به زیست در شرایط فوق سخت وجود دارد[۱۳]. اکثر مطالعات صورت گرفته متمرکز بر نقاط ظهور پرتعداد چشمه‌های آبگرم در کوهپایه‌های رشته کوه‌ها یا قله‌های آتشفشانی فعال یا خاموش بوده است [۱۹ و ۱۱، ۸، ۶]. در ایران نیز نقاط متعدد و چشمه‌های آبگرم متنوعی در دامنه رشته کوه‌های البرز و زاگرس وجود دارند که ٦٦ چشمه آبگرم شناسایی شده روستایی نقش مهمی در گردشگری سلامت ایفا می‌کنند. علیرغم وجود این تعداد آبگرم در کشور مطالعات جامعی در ارتباط با شناسایی ظرفیت ژنتیکی و زیستی و میکروبی این چشمه‌ها صورت نگرفته است [۳]. عمده تحقیقات انجام شده در ایران بر شناسایی آنزیم‌های گرمادوست و یا جداسازی باکتری‌های کشت پذیر این چشمه تمرکز داشته است [٤ و ۲، ۱]. در این تحقیق با استفاده از روش‌های مستقل از کشت که بر پایه تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی استوار است جامعه میکروبی و سایر خصوصیات بیولوژیک و فیزیکوشیمیایی چشمه آبگرم قینرجه به عنوان داغ‌ترین چشمه آبگرم ایران و یکی از داغ‌ترین چشمه‌ها در دنیا مورد مطالعه و کاوش دقیق‌تر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

موقعیت جغرافیایی محل نمونه برداری

چشمه بسیار داغ کلریدی قینرجه (38°17'13.9"N 47°41'06.7"E) در جنوب مشکین شهر در استان اردبیل در شمال غربی ایران در دامنه کوه آتشفشانی سبلان واقع شده است. میزان جریان این چشمه ۹ لیتر در ثانیه است و برای درمان بیماری‌های مانند رماتیسم مورد استفاده مردم قرار می‌گیرد (شکل ۱).

نمونه‌برداری جمعیت باکتریایی

به‌منظور جداسازی میکروارگانیسم‌ها و استخراج DNA آنها، ۳۰ لیتر آب این چشمه با استفاده از پمپ وکیوم و واحد فیلتراسیون تحت خلاء یکبار مصرف ۰/۲ میکرومتر (Cat No.:18080-M, (Sartolab® 150V, PES) Sartorius Stedim Co. Germany) جمع‌آوری و به منظور حذف تاثیر تفاوت دمایی در اثر انتقال آب در محل چشمه فیلترگردید (شکل ۲).

آنالیز فیزیکوشیمیایی

اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب از جمله دما، pH و TDS در زمان نمونه برداری در محل چشمه آبگرم با استفاده از pH متر قابل حمل طبق روش کار مربوطه صورت گرفت [۱۵].

استخراج DNA متاژنومیک

gDNA کل با شستشوی فیلتر ۰/۲ میکرومتری جداشده و بااستفاده ازپروتکل اصلاح شده در مقاله سیداپورا و همکاران (Siddhapura et. al., 2010) مورد استخراج قرار گرفت [۱۷]. غلظت DNA دو رشته در محصول استخراجی با استفاده از کیت سنجش dsDNA Quant-iT dsDNA و فلورومتر Qubit(Invitrogen, USA). تعیین شد.

ساخت کتابخانه ژن 16S rRNA ریبوزومی

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 ایتدا و انتهای توالی می‌باشد که به لحاظ بیولوژیک باید علاوه بر تکثیر اختصاصی ژن 16S ریبوزومی توانایی تکثیر این ژن در همه باکتری‌ها 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 بر روی آغازگرهای متاژنومی، توالی خاصی برای استفاده در فرآیند توالی‌یابی NGS که مکمل یک رشته دیگر بر روی ذره (Beads) یا واحدهای توالی یابی می‌باشد قرار می‌گیرند که اصطلاحاً Lib و یا آداپتور گفته می‌شوند. توالی‌های Lib در هر دو آغازگرمستقیم و معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرند و در واقع این توالی‌ها به عنوان آغازگر توالی‌یابی استفاده می‌گردند و به آنها Fusion Primers نیز گفته می‌شود. توالی مخصوص توالی‌یابی برای آغازگر مستقیم شامل توالی 5'- CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC -3' و برای آغازگر معکوس شامل توالی 5'- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC -3' می باشد. برنامه تکثیری این آغازگرها جهت انجام واکنش مربوطه مشتمل بر یک سیکل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ سیکل از دمای ۹۵ درجه واسرشت سازی به مدت ۲۰ ثانیه و دمای اتصال ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیری ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه می باشند.

توالی‌یابی با سیستم FLX 454 titanium، آنالیز داده‌های خام و طبقه‌بندی تاکسونومیک

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 توالی یابی با پایپلاین SILVAngs (https://ngs.arb-silva.de/silvangs) صورت گرفت. فرایند آنالیز داده‌های خام توسط این پایپلاین بوسیله پنج ماژول بنیادی صورت گرفت. مراحل مختلف فرایند آنالیز شامل همردیف‌سازی (align)، کنترل کیفی (quality control)، تقلیل توالی ها (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 را در مراحل بدی آنالیز قرار نمی‌گیرند. در مرحله تقلیل توالی‌ها و خوشه‌سازی به منظور کاهش زمان و امکان پذیری نرم‌افزاری انجام آنالیز تمامی خوانش‌های کنترل کیفی شده موفق در حالت تشابه صددرصدی در قالب خوشه‌های دسته‌بندی شده قرار می‌گیرند. در نهایت طولانی‌ترین خوانش از هر خوشه با ابزار Blast و بر اساس پایگاه داده‌های SILVA مورد طبقه‌بندی تاکسونومیک قرار می‌گیرند.

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه چشمه آبگرم قینرجه نشان داد که این چشمه با دمای ۸۲ درجه سانتی گراد و با میزان بالای یون کلراید داغترین چشمه کلرایدی ایران به شمار می رود. ترکیبات شیمیایی و خصویات فیزیکی دیگر آب این چشمه در جدول ۲ ذکر گردیده است.

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 گردید. بعد از تکثیر PCR در دستگاه با روش و پروتکل مذکور ، جهت تأیید انجام موفق PCR و ساخت کتابخانه ژن 16s ، 3μl از محصول روی ژل آگارز ۱% الکتروفورز گردید (شکل ۳ الف و ب).

پردازش داده های خام: پردازش داده‌های انبوه حاصل از توالی‌یابی نسل جدید با پایپلاین SILVAngs به تفکیک ۹۶۳۳ توالی و حذف ۳۲۸ توالی در مرحله اول منتهی گردید. میانگین طول قطعات خام و همردیف شده ۴۶۹ جفت باز بود که ۹۴/۵۳ درصد معادل ۹۱۰۶ توالی جهت طبقه بندی تاکسونومیک دسته بندی گردیدند (جدول ۳).

جدول ۱. مشخصات توالی و دمایی پرایمرهای مورد استفاده جهت ساخت کتابخانه

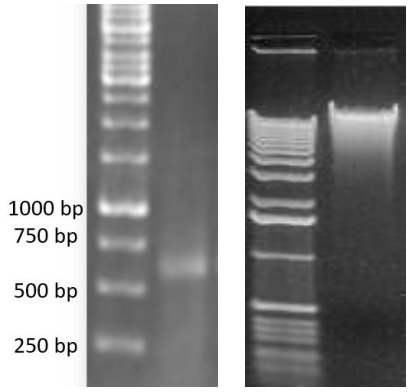
Primer name	Sequence (5` to 3`)	Tm (°C)	GC content (%)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	64	50
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	69	65

شکل ۱ . محدوده جغرافیایی مکان نمونه گیری

شکل ۲. جداسازی میکروبیوم آب چشمه قینرجه در محل نمونه برداری با سیستم فیلتراسیون خلاء

جدول ۲. خصوصیات فیزیکی و ترکیبات شیمیایی چشمه آبگرم قینرجه

پارامتر فیزیکوشیمیایی	چشمه آبگرم قینرجه
pH	6.53
Temp.	82 °C
TDS	3046.5 (mg/L)
Cl	2500 (mg/L)
SO4	350 (mg/L)
As	1.5 (mg/L)
Na	978.2 (mg/L)
K	128.3 (mg/L)
Ca	97.4 (mg/L)



شکل ۳. الکتروفورز الف) DNA متاژنومیک استخراج شده وب) کتابخانه تکثیری ژن 16S rRNA باکتریایی

جدول ۳. نتایج پردازش بیوانفورماتیکی داده های خام توالی یابی ژن 16S rRNA میکروبیوم چشمه آبگرم قینرجه

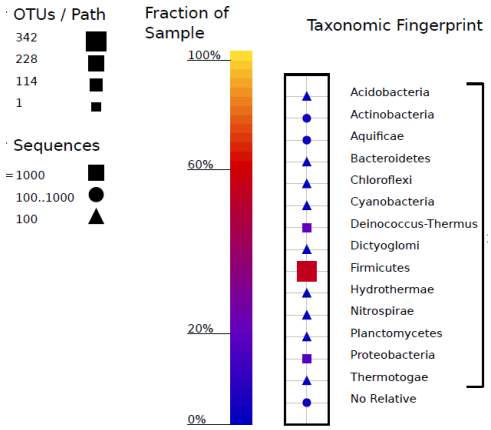
Sequence Type:	SSU	
Number of Samples:	1	
Number of Sequences:	9,633	
Number of Rejected Sequences:	328	(3.40%)
Raw Sequence Information		
Min. Length:	40	
Avg. Length:	469	
Max. Length:	766	
Aligned Sequence information		
Min. Length:	40	
Avg. Length:	469	
Max. Length:	561	
Quality Information		
Alignment BP Score:	41	
Alignment Identity:	54	
Alignment Score:	52	
Ambiguous Bases:	-	
Homopolymers:	4	
Quality:	-	
Length:	177	
Clustering Information		
Number of OTUs:	724	(7.52 %)
Number of Clustered Sequences:	3,325	(34.52 %)
Number of Replicates:	5,256	(54.56 %)
Classification Information		
Number of Classified Sequences:	9,106	(94.53 %)
Number of \No Relative":	199	(2.07 %)

بررسی و تحلیل دقیق توالی‌های پردازش شده و انطباق داده‌های خوشه بندی شده با پایگاه داده‌های اختصاصی ژنهای ریبوزومی مانند RDP جمعیت باکتریایی این چشمه را در ۲۰۲ تاکسون مختلف تا سطح جنس و گونه طبقه بندی نمود. همچنین با انگشت نگاری تاکسونومیک صورت گرفته مشخص گردید این تعداد تاکسون و گونه باکتریایی از ۱۴ شاخه تاکسونومیک نشات گرفته‌اند. در این بین شاخه Firmicutes بیشترین کمیت و نسبت را در این جامعه باکتریایی به خود اختصاص داده و شاخه‌های Deinococcus-Thermus و Proteobacteria در رده‌های بعدی قرار گرفتند.

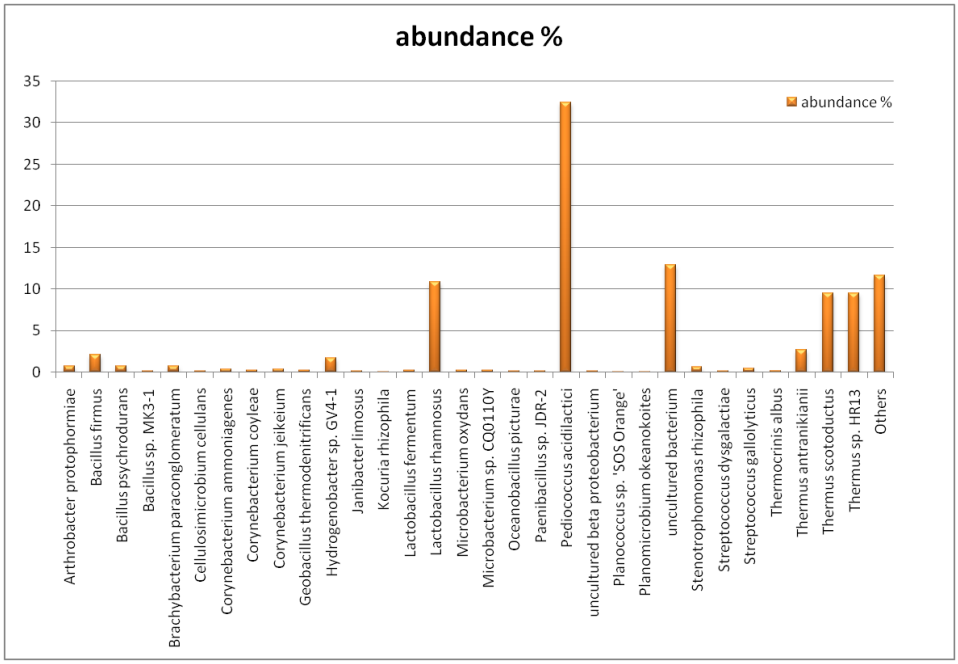
همچنین با دسته بندی گونه‌های باکتریایی به دودسته دارا بودن ۱۰ خوانش یا توالی و بیشتر و یا کمتر از ۱۰ توالی، تعداد ۳۱ گونه باکتریایی با دارا بودن ۱۰ توالی یا بیشتر مجموعا به میزان ۸۸/۳۲۵ درصد و ۱۸۱ گونه باکتریایی دیگر با تعداد توالی کمتر از ۱۰ عدد مجموعا ۱۱/۶۷۵ درصد جمعیت باکتریایی این چشمه را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۵).

با تحلیل دقیق‌تر تاکسون‌ها جمعیت باکتریایی چشمه آگرم قینرجه مشخص گردید بر خلاف تصور اولیه مبنی بر غیر قابل حیات یا فوق اکستریم بودن شرایط زیستی و تاثیر بر تنوع محدود زیستی این چشمه، تنوع بسیار بالایی از گونه‌های مختلف باکتریایی در جامعه میکروبی این چشمه مشاهده می‌گردد. علاوه بر آن تخصصی شدن ترکیب و فراوانی اعضای این جامعه میکروبی با ۵ تاکسون فوق غالب نشان می‌دهد تکوین و توسعه جامعه باکتریایی می‌تواند بر بستر تنوع زیستی آن جامعه و متاثر از شرایط محیطی و فیزیکوشیمیایی باشد که باکتری Pediococcus acidilactici با تقریبا ۳۲/۵ درصد این جمعیت سازگارپذیری و مقاومت زیستی بالای این گونه باکتریایی را نشان می‌دهد. همچنین باکتری‌های Lactobacillus rhamnosus، Thermus scotoductus و Thermus antranikianii در رده‌های بعدی و با فراوانی بیتشری نسبت به سایر باکتری‌ها نشان دهنده سیر تکوینی و تخصصی‌تر شدن جامعه باکتریایی به باکتری‌های گرمادوست می‌باشد.

در مطالعه کریستیانسن و همکاران ۱۹۹۴ باکتری Thermus scotoductusبه عنوان یک باکتری تولید کننده رنگدانه شبه ملانین معرفی شده و قابلیت بهره برداری بیوتکنولوژیک را دارد [۱۰]. همچنین در تحقیق دیگری شرودر و همکاران در باکتری Thermus antranikianii موفق به شناسایی آنزیم گلیکوزید هیدرولازی متعلق به خانواده ۲ این آنزیم‌ها و با دوبرابر فعالیت آنزیمی بیشتر شدند[۱۶]. شناسایی آنزیم‌های گلیکوزید هیدرولازی ترموفیل با دارا بودن کاربردهای صنعتی و بیوتکنولوژیک ارزشمند موضوع تحقیقات بسیاری در مورد آنالیز متاژنومیک چشمه‌های آبگرم بوده است [۲۲-۲۰ و ۱۸، ۱۲]. با در نظر گرفتن ویژگی‌های جمعیت باکتریایی این چشمه که دارای ۱۲/۸۵ درصد باکتری ناشناخته می باشد لزوم مطالعات در سطح توالی یابی کل ژنوم ابن باکتری‌ها اهمیت بیشتری دارد. پیشنهاد می‌گردد در مرحله بعدی جمعیت میکروبی این چشمه با روش متاژنوم کل مورد توالی‌یابی، آنالیز و شناسایی ژن‌های جدید ترموفیل قرار گیرند.



شکل ۴. نمودار انگشت نگاری تاکسونومیک جامعه باکتریایی چشمه آبگرم قینرجه در سطح تاکسونومیک شاخه باکتریایی



شکل ۵. نمودار گونه‌های غالب باکتریایی جامعه میکروبی چشمه آبگرم قینرجه

تشکر و قدردانی

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

منابع

[۱] حیدري، ف.، رياحي، ح.، يوسف زادي، م.، شريعتمداري، ز.، مطالعه تنوع مورفولوژيكي و فيلوژني سيانوباكتري‌هاي ۴ چشمه آب گرم در ايران، مجله گياه شناسی ايران، جلد ۲ (۳۸):۱۷۲ – ۱۶۲.

[۲] فرهمند، م.، مظفري نور، ا.، مهرابيان، ص.، خاوري نژاد، ر.، بررسي خصوصيات آلفا آميلاز توليد شده به وسيله باكتري هاي ترموفيل جدا شده از چشمه‌هاي آب گرم ايران، مجله پژوهش و سازندگی، جلد ۴ (۸۱): ۱۶۱-۱۶۷.

[۳] گل شیری اصفهانی، ز.، رکن الدین افتخاری، ع.، پورطاهری، م.، ۲۰۱۵، تبیین چرخه‌ی الگوی توسعه‌ی گردشگری سلامت در مناطق روستایی ایران (با تاکید بر چشمه‌های آب گرم). مجله برنامه ریزی و توسعه گردشگری، جلد ۳ (۱۱): ۲۲-۱۱.

[۴] نورمحمدي، ا.، فرهمند، م.،اسماعيلي رستاقي، ا.، شناسايي اكسترموفيل‌هاي توليدكننده آنزيم‌هاي ضدسرطان ال-گلوتاميناز و ال-آسپاراژيناز از چشمه آبگرم لاريجان، مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی، جلد ۸ (۳۱): ۲۹-۳۸.

[5] Blank, C.E., Cady, S.L. and Pace, N.R., 2002. Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. Appl. Environ. Microbiol., 68(10), pp.5123-5135.

[6] Bohorquez, L.C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., Junca, H., Baena, S. and Zambrano, M.M., 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(1), pp.103-115.

[7] Cai, L., Ye, L., Tong, A.H.Y., Lok, S. and Zhang, T., 2013. Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. PloS one, 8(1), p.e53649.

[8] Hedlund, B.P., Reysenbach, A.L., Huang, L., Ong, J.C., Liu, Z., Dodsworth, J.A., Ahmed, R., Williams, A.J., Briggs, B.R., Liu, Y. and Hou, W., 2015. Isolation of diverse members of the Aquificales from geothermal springs in Tengchong, China. Frontiers in microbiology, 6, p.157.

[9] Hou, W., Wang, S., Dong, H., Jiang, H., Briggs, B.R., Peacock, J.P., Huang, Q., Huang, L., Wu, G., Zhi, X. and 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(1), p. e53350.

[10] Kristjánsson, J. K., Hjörleifsdóttir, S., Marteinsson, V.T. and Alfredsson, G. A., 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(1), pp.44-50.

[11] Kumar, M., Yadav, A.N., Tiwari, R., Prasanna, R. and Saxena, A.K., 2014. Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs. Annals of microbiology, 64(2), pp.741-751.

[12] Kurosawa, N., 2013. Discovery of thermostable enzymes from hot environmental samples by metagenomic approaches. In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology (pp. 413-427). Springer, Dordrecht.

[13] Lau, M.C., Aitchison, J.C. and Pointing, S.B., 2009. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. Extremophiles, 13(1), pp.139-149.

[14] Liu, L., Salam, N., Jiao, J.Y., Jiang, H.C., Zhou, E.M., Yin, Y.R., Ming, H. and Li, W.J., 2016. Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. Microbial ecology, 72(1), pp.150-162.

[15] Prieto-Barajas, C.M., Alfaro-Cuevas, R., Valencia-Cantero, E. and 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(3), pp.616-624.

[16] Schröder, C., Blank, S. and 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, p.76.

[17] Siddhapura, P. K., Vanparia, S., Purohit, M. K. and Singh, S. P., 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(3), pp. 375-379.

[18] Tang, K., Kobayashi, R.S., Champreda, V., Eurwilaichitr, L. and Tanapongpipat, S., 2008. Isolation and characterization of a novel thermostable neopullulanase-like enzyme from a hot spring in Thailand. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 72(6), pp. 1448-1456.

[19] Tekere, M., Lötter, A., Olivier, J., Jonker, N. and Venter, S., 2011. Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. African Journal of Biotechnology, 10 (78), pp. 18005-18012.

[20] Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L., 2008. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. Journal of Biotechnology, 133(1), pp. 42-49.

[21] Zarafeta, D., Kissas, D., Sayer, C., Gudbergsdottir, S.R., Ladoukakis, E., Isupov, M. N., Chatziioannou, A., Peng, X., Littlechild, J. A., Skretas, G. and Kolisis, F.N., 2016. Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. PLoS One, 11(1), p.e0146454.

[22] Zhao, C., Chu, Y., Li, Y., Yang, C., Chen, Y., Wang, X. and Liu, B., 2017. High-throughput pyrosequencing used for the discovery of a novel cellulase from a thermophilic cellulose-degrading microbial consortium. Biotechnology letters, 39(1), pp.123-131.

The effect of exosomes derived from bone marrow stem cells on the levels of estradiol and testosterone secreted from the ovarian granulosa cells of immature NMRI mice

Azarbaijani R.[1], Parsa Yeganeh L.[1*]

[1] Molecular bank, Iranian Biological Resource Center, ACECR, Karaj, Iran

* Email: la_yeganeh@yahoo.com

Received: December 2019 Accepted: February 2020

Abstract

Hot spring extreme ecosystems are important biological resources for identifying the genetic stocks of thermophilic microorganisms and their biological characteristics in terms of tolerance and survival in high temperatures in order to use of their potential in various industries and biotechnology. Although there have been many studies on the microbiome of these biomass in recent years in the world, so far few studies have been done on such indigenous extreme environments of Iran. Iran has a variety of geothermal and volcanic areas which contained numerous unique springs with antimicrobial and antifungal, anti-rheumatism and other muscle aches properties. In this study, the identification of composition of different taxa of the bacterial community of Qeynarjeh hot spring as one of the hottest chloride springs in the world with the temperature of 86° C was performed by independent cultivation methods using next generation sequencing techniques. For quantitative profiling of the relevant bacterial community or so-called metagenomics analysis, 16s rRNA gene libraries were constructed from three functional regions of taxonomic classification V1 to V3 with barcoded primers. Using bioinformatics analysis, 200 different taxa belonging to different bacterial families and genera were identified with MG-RAST and SILVAngs systems. The dominant taxa with the most abundant, are respectively: *Pediococcus acidilactici* ،uncultured (unclassified) bacterium ،*Lactobacillus rhamnosus* ، *Thermus scotoductus* ،*Thermus sp. HR13* و *Thermus sp. BXR*..

Keywords: Extreme ecosystem, Qeynarjeh hot spring, metagenomics, microbiome.