Applied Biology, Volume 10, Issue 38, 2020

Identification and Enzymatic Characterization of Hyperhalophilic Bacteria Isolates from Howz Soltan Lake[1]

Fahimeh Mahmoudnia | Asistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Farhangian University, Tehran, Iran.
f.Mahmoudnia@cfu.ac.ir

Abstract

Introduction: The study of microorganisms in specific regions with specific characteristics has long been important. Howz Soltan is a salt lake in the central desert zone of Iran, which is considered as an area of great salinity. The present study was conducted to isolate halophilic bacteria from Howz Soltan lake in order to achieve maximum information concerning to microbial diversity of the lake.

Material and methods: For this purpose, samples were collected from five regions. Then the samples were diluted and cultivated on Molten haloid agar with different salt concentrations (5-35%). The plates were incubated at 37ºC in aerobic conditions. Biochemical characterizations, utilization of carbon sources and production of exoenzymes were investigated.

Results: In total 205 different colonies were grew on medium with 5-35% salt concentrations. Of all isolates 18 strains were grew on medium with 15-35% salt concentrations. These strains were considered extreme halophilic bacteria and the rest were halotolerant and moderate halophilic bacteria. The results obtained from microscopic analysis of the isolates indicated that 178 isolates were gram positive bacilli, cocci and filamentous and 27 isolates were gram negative with bacilli shape. Phenotypic identification recognized that the isolated strains of extreme halophilic bacteria were *Halobacterium* ,*Haloarcula* ,*Halorubrum* and *Halococcus.* In addition, enzyme production assay of these strains showed some of them have capability to produce different enzymes viz., amylase, lipase, protease, DNase, urease, xylanase and gelatinase.

Conclusion: In general, our finding showed the huge diversity of halophilic bacteria in Howz Soltan lake. Furthermore, these bacteria could be considered as sources of halotolerant enzymes in different industries.

Keywords: Salt lake, isolation of bacteria, Halophilic bacteria, Enzyme of bacteria.

1. **Received:** 2019/08/08 ; **Accepted:** 2020/05/07

**Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۳۸، تابستان۱۳۹۹

مطالعه تعیین ویژگی‌های آنزیمی باکتری‌های شدیدا نمک دوست جداسازی شده از دریاچه حوض سلطان[۱]

فهیمه محمودنیا | استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران. f.Mahmoudnia@cfu.ac.ir

چکیده

هدف: از دیرباز مطالعه بر روی میکروارگانیسم‌های مناطق ویژه با مشخصات خاص از اهمیت فراوانی برخوردار بوده است. دریاچه نمک حوض سلطان یکی از دریاچه‌های شور منطقه کویر مرکزی ایران می‌باشد که از نظر وسعت و میانگین شوری مورد توجه قرار گرفته است. تحقیق حاضر در جهت جداسازی باکتری‌های نمک دوست به منظور کسب اطلاعات بیشتر درباره تنوع میکروبی این دریاچه انجام شد.

مواد و روش‌ها: از پنج منطقه دریاچه حوض سلطان نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها رقیق‌سازی گردید و بر روی محیط مولتن هالوئیدآگار با غلظت‌های مختلفی از نمک (٪۳۵-۵) کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷°C تحت شرایط هوازی انکوبه گردیدند. خصوصیات بیوشیمیایی، استفاده از منابع کربن و تولید اگزوآنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۲۰۵ سویه در محیط‌های حاوی (٪۱۵- ۵) نمک، رشد کردند. از بین سویه‌های جداسازی شده، ۱۸ سویه در محیط حاوی ٪۳۵- ۱۵ غلظت نمک رشد داشتند که می‌توان آنها را به عنوان باکتری‌های شدیدا نمک دوست مورد توجه قرار داد. نتایج بدست آمده از بررسی‌های میکروسکوپی بیانگر آن است که ۱۷۸سویه باسیل، کوکسی و اشکال رشته‌ای گرم مثبت بوده و ۲۷ سویه باسیل گرم منفی می‌باشند. در شناسایی فنوتیپی سویه‌های ایزوله شده از باکتری‌های نمک دوست افراطی، جنس‌های *هالوباکتریوم* (*Halobacterium*)، *هالوآرکئولا* (*Haloarcula*)، *هالوروبروم* (*Halorubrum*) و *هالوکوکوس* (*Halococcus*) تشخیص داده شدند. علاوه براین، با بررسی تولید آنزیم توسط این سویه‌ها مشخص شد که برخی از آنها توانایی تولید آنزیم‌های متفاوتی مانند: آمیلاز، لیپاز، دی ان آز، اوره آز، گزیلاناز و ژلاتیناز را دارند.

نتیجه‌گیری: دریاچه حوض سلطان از تنوع میکروب‌های نمک دوست وسیعی برخوردار است. علاوه براین، این باکتری‌ها می‌توانند به عنوان منبعی جهت تولید آنزیم‌های تحمل‌کننده نمک در صنایع گوناگون کاربردهای فراوانی داشته باشند.

کلیدواژه‌ها: دریاچه نمک، جداسازی باکتری‌ها، باکتری‌های نمک دوست، آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۵/۱۷ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۲/۱۸

۱. مقدمه

دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در زیستگاه‌های گوناگون با ویژگی‌های معتدل تا محیط‌هایی با شرایط سخت نظیر چشمه‌های آب گرم، دهانه‌های دودکشی آتشفشان‌ها در اعماق اقیانوس‌ها، معادن نمک و حتی مکان‌هایی که امکان حیات در آنها مشاهده نمی‌شود، زندگی می‌کنند (۱). به طور شگفت‌آوری، میکروارگانیسم‌ها در شرایط دشوار حاکم بر این زیستگاه‌ها زندگی می‌کنند و استراتژی‌های خاصی را برای حیات به کار می‌برند که می‌توانند منشاء تحقیقات بیوتکنولوژیکی باشند (۲).

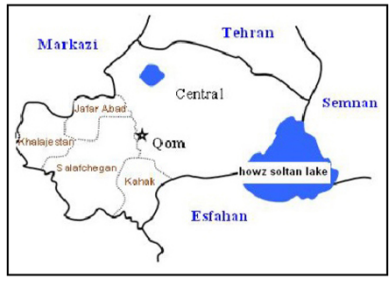
وجود نمک در محیط با غلظت‌های بالای ۳% عامل استرس و فشار بر روی حیات می‌باشد. باکتری‌های نمک دوست اساساً ارگانیسم‌هایی می‌باشند که توانایی برقراری تعادل فشار اسمزی را در محیط‌های نمکی دارا بوده و قادر به حیات در محیط‌های بسیار شور هستند (۳). محیط‌های نمکی، جایگاه زندگی با تنوع گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های نمک دوست هستند که گاه قادر به ادامه زندگی در شرایط عادی نبوده و برای بقاء، نیازمند غلظت بالای نمک می‌باشند. باکتری‌های نمک دوست می‌توانند براساس الگوی رشد و نیازمندیشان به نمک، طبقه‌بندی شوند. بهینه رشد نمک دوست‌های ضعیف در غلظت ۵%-۲، نمک دوست‌های نسبی در غلظت ۱۵%- ۵ و نمک دوست‌های افراطی در غلظت ۳۵%-۱۵ نمک، صورت می‌گیرد (۴).

مطالعات بر روی حیات میکروب‌ها در دریاچه‌های نمکی آشکار کرده است که ارگانیسم‌های این محیط‌های طبیعی شامل ارگانیسم‌های میکروسکوپی نظیر یوکاریوت‌های چندسلولی، جلبک‌ها، قارچ‌ها و پروکاریوت‌های میکروسکوپی شامل سیانوباکترها، انواع باکتری‌های اکسیدکننده سولفور، باکتری‌های فتوتروفیک و رنج وسیعی از آرکی‌ها می‌باشد (۳). بر این اساس مطالعه بر روی حیات میکروبی دریاچه‌های نمکی می‌تواند در دستیابی به نتایجی درباره کشف میکروارگانیسم‌های جدید یا فرآورده‌های جدید آنها، بسیار مفید واقع شود (۵).

چنین مطالعاتی همچنین می‌تواند در فهم مکانیسم‌های مرتبط با بقاء، در شرایط بسیار دشوار حیات، کمک شایانی نماید.

بنابراین، تحقیق حاضر درصدد جداسازی باکتری‌های نمک دوست افراطی و تعیین خصوصیت تولید آنزیم‌های هیدرولازی مختلف آنها از دریاچه نمک حوض سلطان است. این دریاچه یکی از دریاچه‌های شور در منطقه کویر مرکزی ایران می‌باشد که در ۴۰ کیلومتری شمال

استان قم و ۸۵ کیلومتری استان تهران قرار دارد (شکل۱). این دریاچه دارای شکلی شبیه به یک مثلث می‌باشد که نوک آن به سمت شمال است. طول واقعی آن ۸۰ کیلومتر با عرضی معادل ۶۰ کیلومتر و ارتفاع ۷۹۰ متر بالاتر از سطح دریا بوده که دارای مساحتی حدود ۱۸۰۰ کیلومتر مربع می‌باشد و تنها ۱ کیلومتر مربع آن از آب پوشیده شده است و عمق آب آن بین ۴۵ سانتی‌متر تا ۱ متر است. وسعت و شکل دریاچه متناسب با بارندگی و ورود آب در فصول مختلف سال متفاوت است. نمک در سطح دریاچه به صورت کریستال‌های مختلط با تنوع رنگی زیاد از سفید تا صورتی و خاکستری تا سیاه مشاهده می‌شود که تا عمق۴۶ متری دریاچه وجود دارد. میانگین شوری دریاچه ۳۶۰ گرم در لیتر با اسیدیته ۸/۶ می‌باشد و آب و خاک دریاچه غنی از عناصری همچون کلسیم، منیزیم، پتاسیم، سولفات و کربنات است (۶).

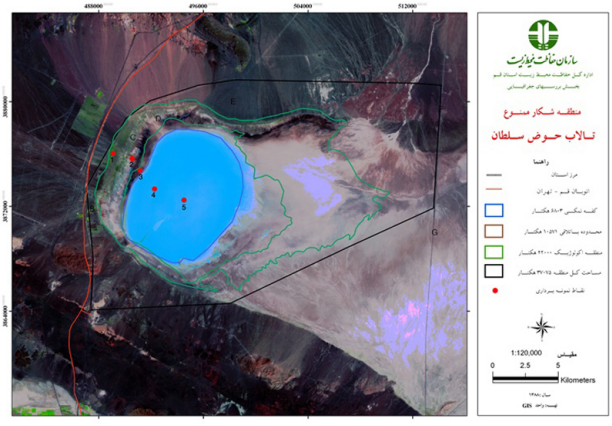


شکل۱- موقعیت جغرافیایی دریاچه حوض سلطان

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌گیری

به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی منطقه حوض سلطان، نمونه‌هایی از نقاط مختلف دریاچه شامل پنج منطقه (منطقه۱: پوشش گیاهی، منطقه۲: خاک‌های رسی، منطقه۳: چند ضلعی، منطقه۴: ابتدای پوسته نمکی و منطقه ۵: کفه نمکی) جمع‌آوری گردید. در هر منطقه از قسمت‌های سطحی و عمق ۱۰تا ۵۰ سانتی‌متری، نمونه‌هایی از آب نمک اشباع جمع شده در زیر لایه‌های نمکی، گل ولای، لجن و کریستال‌های نمکی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با استفاده از وسایل و ظروف استریل جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند تا آزمایشات بر روی آنها انجام گیرد. شکل۲ نقاط نمونه‌برداری را بر روی نقشه هوایی و جدول ۱ مشخصات نقاط نمونه‌برداری را نشان می‌دهد.



شکل۲- نقاط نمونه‌برداری شده از دریاچه حوض سلطان بر روی نقشه هوایی

جدول۱- مشخصات محیطی - جغرافیایی و نوع نمونه‌ها از مناطق نمونه‌برداری

نقاط نمونه‌برداری	مشخصات جغرافیایی	نوع نمونه
منطقه ۱ (منطقه پوشش گیاهی)	ط: ۴۸۸۱۹۱ ع: ۳۸۷۲۶۹	خاک‌های اطراف ریشه و ساقه گیاهان
منطقه ۲ (منطقه خاک‌های رسی)	ط: ۴۸۹۶۶۵ ع: ۳۸۶۹۵۶۳	خاک‌های رسی، لجن نمکی
منطقه ۳ (منطقه چندضلعی)	ط: ۴۸۹۹۹۴ ع: ۳۸۷۰۰۰۰	خاک‌های شوره‌ای و لجن‌های نمکی
منطقه ۴ (ابتدای پوسته نمکی)	ط: ۴۹۰۹۱۹ ع: ۳۸۷۰۸۹۸	کریستال‌های نمکی، آب و لجن‌های نمکی
منطقه ۵ (کفه نمکی)	ط: ۴۹۱۵۹۱ ع: ۳۸۷۱۲۰۴	کریستال‌های نمکی و کمی آب نمک اشباع

۲-۲. جداسازی میکروارگانیسم‌ها

جداسازی میکروارگانیسم‌های بومی منطقه بر روی محیط مغذی مولتن هالوئید آگار(شرکت مرک، آلمان) که حاوی عصاره مخمر(۱۰گرم در لیتر)، پپتون پروتئوس (۵ گرم در لیتر)، گلوکز(۱گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۱۰۰گرم در لیتر)، کلرید منیزیم (۷ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۹/۶گرم در لیتر)، کلریدکلسیم (۰/۶۳گرم در لیتر)، کلرید پتاسیم (۲ گرم در لیتر)، کربنات سدیم (۰/۰۶گرم در لیتر) و برومیدسدیم (۰/۰۶۲گرم در لیتر) بود، انجام شد (۷).

برای جداسازی میکروب‌ها از نمونه‌های خاک با استفاده از محلول نمکی استریل حاوی ۱۰میلی گرم نمک در۱۰۰۰میلی لیتر آب، رقت‌های متوالی (10^{-1}-10^{-7}) تهیه گردید و ۱میلی لیتر از هر رقت به طور جداگانه در سطح پلیت مولتن هالوئیدآگار گسترش داده شدند (۸، ۹).

لازم به ذکراست که برای جداسازی میکروب‌های خاک دریاچه، رقت‌های موردنظر با استفاده از محلول نمکی با غلظت پایین‌تر تهیه شد تا به این وسیله تمامی میکروب‌های خاک نمونه‌برداری شده از دریاچه (هم نمک دوست‌ها و هم تحمل‌کننده‌های نمک) امکان رشد در محیط تهیه شده را داشته باشند. همچنین از حذف سویه یا سویه‌هایی، ممانعت شود. به منظور جداسازی میکروب‌های آب دریاچه،۱۰میلی لیتر از آب دریاچه (که در زیر لایه کریستالی نمک جریان داشت و غلظت نمک آن در حد اشباع بود)، با۳۰ میلی لیتر محیط مولتن هالوئیدآگاراتوکلاو شده، در داخل پلیت مخلوط شد و جهت جداسازی نمونه‌های کریستالی، یک گرم کریستال نمک که فاقد ذرات رسوبی و خاک بود، سه مرتبه با آب نمک استریل ۱۰% شستشو داده شد، سپس در ۵۰ میلی‌لیتر آب نمک استریل ۱۰% حل گردید، در مرحله بعد نیمی از آن محلول بدست آمده با۲۰ میلی‌لیتر محیط مولتن هالوئیدآگار اتوکلاو شده، مخلوط شده و با استفاده از تکنیک پورپلیت کشت داده شد (۸،۹،۱۰).

pH محیط‌های کشت با استفاده از پتاس ۱ مولار قبل از اتوکلاو کردن در حدود ۷/۲ – ۷/۴ تنظیم گردید. پلیت‌ها تحت شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز انکوبه شدند. سپس کلنی‌های بدست آمده جهت آزمایشات بعدی خالص‌سازی گردیدند[1] (۸ ، ۱۱).

۲-۳. جداسازی سویه‌های تحمل‌کننده نمک و نمک دوست

برای افتراق میکروارگانیسم‌های تحمل‌کننده نمک از میکروارگانیسم‌های نمک دوست نسبی و مطلق از محیط کشت نوترینت آگار با غلظت‌های مختلف نمک ۳۵ % -۰ استفاده شد. چنانچه سویه‌ای زیر ۳ درصد غلظت نمک رشد بهینه داشته باشد، تحمل‌کننده نمک و بالای آن در گروه نمک دوست‌ها و یا از انواع نمک دوست‌های افراطی (۳۵-۲۵%) به شمار می‌آیند (۱۱،۱۲).

---

۱. لازم به ذکر است که تمام مواد و ترکیبات مصرف شده در این تحقیق متعلق به شرکت مرک (Merck) کشورآلمان می‌باشد.

۲-٤. شناسایی بیوشیمیایی نمونه‌های جداسازی شده

خصوصیات ظاهری کلنی‌ها بر روی محیط نوترینت آگار (مرک – آلمان) به همراه ۱۰ درصد کلرید سدیم پس از سه روز مشاهده شد. در مورد برخی از سویه‌های نمک دوست نسبی و نمک دوست مطلق که کند رشد بودند، خصوصیات مرفولوژیک آنها پس از ۷ تا ۱۰روز مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی کلنی‌های بدست آمده از دریاچه، ابتدا از روش رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد و برای حصول اطمینان با استفاده از محلول هیدروکسید پتاسیم ۳% نیز بررسی واکنش گرم در سویه‌ها تکرار گردید. سپس فعالیت کاتالاز و اکسیدازی میکروارگانیسم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و به دنبال آن تعیین مصرف منابع کربن در محیط‌های حاوی قندهای مختلف(گلوکز در شرایط هوازی و بی‌هوازی، آرابینوز، مالتوز، سوکروز، فروکتوز، گزیلوز، مانیتول و نشاسته) صورت پذیرفت. احیای نیترات، کشت در محیط MR-VP (متیل رد و وژپروسکوئر)، بررسی حرکت باکتری، مصرف سیترات، تولید اسید و گاز از گلوکز، تولید ایندول، تولید سولفید و تولید اوره آز نیز مورد مطالعه قرار گرفت که کلیه آزمایش‌های ذکر شده در محیط‌هایی با ۱۰ درصد کلرید سدیم انجام شد (۷، ۸، ۱۲، ۱۳).

۲-۵. بررسی حضور آنزیم‌های مختلف

در این مرحله، سنجش به روش پلیت انجام شد، به طوری که هر یک از سویه‌های جداسازی شده و منتخب را بر روی محیط ویژه محتوی سوبسترای مورد نظر و ۱۰ درصد نمک کلرید سدیم کشت داده تا بتوان تولید آنزیم‌های مختلف را در آنها مشاهده کرد.

۲-٦. سنجش تولید آنزیم آمیلاز

برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز از محیط استارچ آگار به همراه ۱۰% کلرید سدیم استفاده گردید. به طوری که نمونه‌های خالص شده بر روی محیط کشت مذکور به صورت خطی کشت داده شده و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز، پلیت‌ها با محلول یدیدپتاسیم پوشیده شد و ظهور ناحیه شفاف اطراف کلنی‌ها به عنوان نشانه هیدرولیز نشاسته ثبت گردید (۱۴) .

۲-۷. سنجش تولید آنزیم پروتئاز

جهت تعیین حضور آنزیم پروتئاز از محیط اسکیم میلک به همراه ۱۰% کلرید سدیم و

نوترینت آگار استفاده شد که تمامی ترکیبات محیط به جز اسکیم میلک (شرکت مرک آلمان) در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیده و اسکیم میلک از طریق صاف کردن، استریل شد. نمونه‌های مورد نظر بر روی محیط کشت مذکور کشت داده شد و به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از گذشت زمان مذکور ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی‌ها به عنوان نشانه تولید آنزیم ثبت شد (۷).

۲-۸. سنجش تولید آنزیم DNase

برای بررسی تولید این آنزیم از محیط دی.ان.ای آگار (شرکت مرک آلمان) همراه با تولوئیدین بلو و ۱۰% کلرید سدیم استفاده شد. پس از کشت نمونه‌ها بر روی محیط مذکور، پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و پس از گذشت این زمان با افزودن اسید کلریدریک ۱ نرمال بر روی باکتری‌های رشد یافته، ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵).

۲-۹. سنجش تولید آنزیم لیپاز

سنجش تولید آنزیم لیپاز با استفاده از محیطی با ترکیب زیر صورت پذیرفت. سپس کشت بر روی محیط مذکور و انکوباسیون به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ارزیابی وجود آنزیم کمک کرد. به طوری که مشاهده ایجاد رسوب سفید رنگ اطراف کلنی‌ها، به عنوان نشانه تولید آنزیم ثبت گردید (۱۶).

Peptone 10g/l + $CaCl_2$. H_2O 0.1g/l + Tween 80 10g/l + NaCl 10%، pH 7.2

۲-۱۰. سنجش تولید آنزیم گزیلاناز

با استفاده از ترکیبات زیر محیط کشت مورد نیاز تهیه گردید و سنجش تولید آنزیم گزیلاناز مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز انکوبه شدند و افزودن معرف کنگورد ۰/۱%، شستن با محلول نمک ۱ مولار و ایجاد هاله شفاف به عنوان نشانه تولید آنزیم ثبت گردید (۱۷).

Xylan 1% + yeast extract 0.2% + peptone 0.5% + $MgSO_4$ 0.05% + $CaCl_2$ 0.015% + NaCl 10% + agar 2%، pH 7.2

۲-۱۱. سنجش تولید آنزیم ژلاتیناز

برای بررسی تولید آنزیم ژلاتیناز از نوترینت ژلاتین (شرکت مرک آلمان) به همراه ۱۰% کلرید سدیم استفاده شد. پس از اتمام انکوباسیون (۷ روز دمای ۳۷ درجه سانتیگراد)، با قرار دادن لوله‌ها در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۰ دقیقه، تولید ژلاتیناز مورد ارزیابی قرار گرفت. به طوری که در صورت مایع بودن محیط پس از خروج از یخچال، نمونه به عنوان مثبت قلمداد گردید (۱۸).

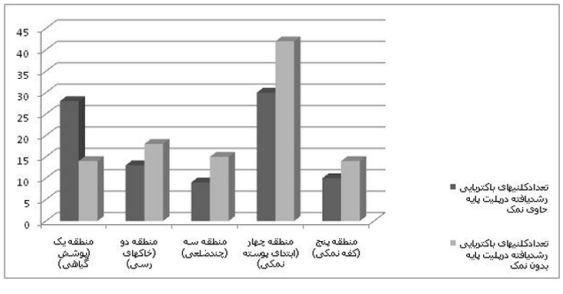
۲-۱۲. سنجش تولید آنزیم اوره آز

برای بررسی تولید آنزیم اوره آز از محیط کشت اوره آگار (شرکت مرک آلمان) به همراه ۱۰% کلرید سدیم استفاده شد که پس از اتمام انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز، تغییر رنگ محیط به صورتی به عنوان نشانه تولید آنزیم ثبت گردید (۱۶) .

۳. یافته‌ها

۳-۱. جداسازی باکتری‌های نمک دوست

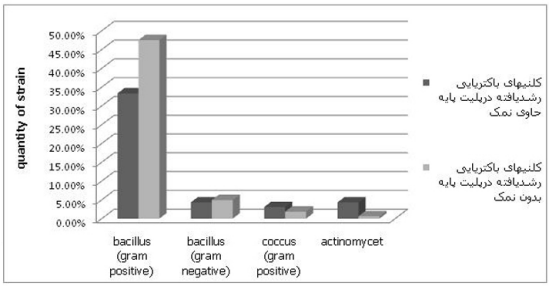
نتایج بدست آمده از مشاهده پلیت‌ها بیانگر آن بود که با توجه به تنوع و تعداد نمونه‌های بدست آمده از هر ۵ منطقه نمونه‌برداری شده، منطقه چهار (ابتدای پوسته نمکی) با مشاهده ۵۲ کلنی به عنوان بیشترین جایگاه جداسازی میکروارگانیسم و منطقه پنج (کفه نمکی) با مشاهده ۲۴ کلنی به عنوان کمترین جایگاه جداسازی میکروارگانیسم می‌باشند (نمودار۱).



نمودار ۱- تعداد کلنی‌های رشدیافته در محیط حاوی نمک و بدون نمک از نمونه‌های ۵ منطقه دریاچه حوض سلطان

همچنین نتایج بدست آمده بیانگر آن است که به طور کلی ۲۰۵ سویه در محیط کشت حاوی ۱۵-۵% نمک رشد یافتند که از میان آنها، ۱۸سویه در محیط حاوی غلظت‌های بالای نمک (۳۵-۱۵%) رشد داشتند که می‌توان آنها را به عنوان نمک دوست‌های

افراطی[1] مورد توجه قرار داد. لازم به ذکر است که از بین ۱۸ سویه منتخب، حتی تعدادی توانایی رشد در محیط حاوی ۳۵-۲۵% نمک را نیز دارا بودند. پس از بررسی‌های میکروسکوپی مشخص شد که از ۲۰۵ سویه جداسازی شده، ۱۳۵سویه باسیل گرم مثبت، ۲۵سویه کوکسی گرم مثبت و ۲۷ سویه باسیل گرم منفی بودند. لازم به ذکر است که ۱۸ سویه اکتینومیست نیز بدست آمد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در نمودار شماره ۲ آمده است.



نمودار ۲- درصد انواع کلنی‌های میکروارگانیسم‌های رشدیافته در محیط‌های حاوی نمک و بدون نمک

۳-۲. تست‌های بیوشیمیایی و آنزیمی

در تحقیق حاضر با توجه به شدیدا نمک دوست بودن ۱۸سویه، سایر آزمایشات بر روی آنها صورت گرفت. به طوری که از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی نظیر: مصرف انواع منابع کربنی مانند (گلوکز در شرایط هوازی و بی‌هوازی، آرابینوز، مالتوز، سوکروز، فروکتوز، گزیلوز، مانیتول و نشاسته) مصرف سیترات، احیای نیترات و تولید اکسیداز، کاتالاز، ایندول، تولید سولفید هیدروژن، بررسی حرکت باکتری، تولید اسید و گاز از گلوکز، کشت در محیط متیل رد و و ژپرسکوئر و تولید اوره آز بر روی آنها، انجام گرفت که نتایج در جداول شماره ۳ و ۴ آمده است. چنانچه در جدول ۴ نشان داده شده، سویه‌های منتخب، منابع مختلف قندی نظیر گلوکز، آرابینوز، لاکتوز، مالتوز و ساکاروز را به عنوان منبع کربنی مورد استفاده قرار دادند. از طرف دیگر، فعالیت‌های آنزیم‌های هیدرولیتیک در سویه‌های جداسازی شده و منتخب نمک دوست افراطی نیز مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۵ آمده است.

لازم به ذکر است که در جداول مذکور، کد میکروارگانیسم نگارش شده شامل نام دریاچه حوض

1. ExtremeHalophils

سلطان، شماره نمونه بدست آمده از دریاچه و پس از آن شماره میکروارگانیسم جداسازی‌شده است.

(H: Howz sultan - number of sample – number of isolate)

بررسی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی بیانگر آن است که احتمالاً سویه‌های جداسازی شده می‌توانند اغلب متعلق به جنس‌های *هالوباکتریوم*[1]، *هالوآرکئول*[2]، *هالوروبروم*[3] و *هالوکوکوس*[4] متعلق به خانواده *هالوباکتریاسه*[5] از گروه *هالوباکتریا*[6] باشند.

جدول ۳- تست‌های بیوشیمیایی بر روی سویه‌های نمک دوست منتخب

Sl. No	Strain	Catalase	Oxidase	MR	VP	Acid & gas production from glucose	Indole	Sulfide production	Motility	Citrate	Nitrate reduction	Urease
1	H1I1	+	-	-	–	A^-/g^-	-	-	-	-	-	-
2	H1I7	+	-	+	-	A^{+w}/g^-	$+^w$	$+^w$	$+^w$	+	-	-
3	H1I9	+	-	+	-	A^+/g^-	$+^w$	$+^w$	$+^w$	+	+	-
4	H3I3	+	+	-	-	A^-/g^-	-	-	-	-	-	-
5	H3I4	+	-	-	-	A^-/g^-	-	-	-	-	-	-
6	H3I6	+	-	+	-	A^+/g^-	-	-	$+^w$	-	-	-
7	H3I9	+	-	+	-	A^{+w}/g^-	-	-	-	+	+	-
8	H9I1	+	-	+	-	A^+/g^-	+	+	+	-	+	+
9	H13I2	+	-	+	-	A^{+w}/g^-	-	-	-	-	+	+
10	H18I1	+	-	-	-	A^-/g^-	-	-	$+^w$	-	+	-
11	H21I1	+	$+^w$	-	-	A^-/g^-	-	-	$+^w$	-	+	-
12	H24I2	+	-	+	-	A^+/g^-	-	-	$+^w$	-	+	-
13	H25I1	+	$+^w$	-	-	A^-/g^-	-	-	+	-	-	-
14	H25I3	+	-	-	-	A^-/g^-	-	-	$+^w$	-	+	-
15	H25I4	+	+	-	-	A^-/g^-	-	-	-	-	-	-
16	H28I1	+	-	-	-	A^-/g^-	-	-	$+^w$	-	+	-
17	H29I2	+	-	-	-	A^-/g^-	-	-	+	-	-	-
18	H30I1	+	$+^w$	-	-	A^-/g^-	-	-	-	-	-	-

1. Halobacterium
2. Haloarcula
3. Halorubrum
4. Halococcus
5. Halobacteriacea
6. Halobacteria

جدول ٤- بررسی منابع کربنی مورد استفاده توسط سویه‌های نمک دوست منتخب

Sl. No	Enzyme / Strain	Amylase	Protease	DNase	Lipase	Xylanase	Urease	Gelatinase
1	H1I1	-	-	-	-	-	-	+w
2	H1I7	-	-	-	-	-	-	+
3	H1I9	+	-	-	+	-	-	+
4	H3I3	+	-	-	-	+w	-	+
5	H3I4	+	-	-	-	+w	-	-
6	H3I6	+	-	-	-	+	-	-
7	H3I9	+	-	-	-	+	-	+
8	H9I1	-	-	-	+	+	+	+
9	H13I2	-	-	-	+w	-	+	-
10	H18I1	-	-	-	+w	-	-	-
11	H21I1	-	-	-	+	-	-	-
12	H24I2	+	-	-	+	-	-	-
13	H25I1	-	-	-	-	-	-	-
14	H25I3	-	-	-	+	+	-	-
15	H25I4	-	-	-	+w	-	-	-
16	H28I1	-	-	-	+	+	-	-
17	H29I2	-	-	-	-	-	-	-
18	H30I1	-	-	-	+	-	-	-

جدول ٥- بررسی فعالیت‌های آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی سویه‌های نمک دوست منتخب

Sl. No	Strain	Glucose aerobic	Glucose anaerobic	Arabinose	Maltose	Sucrose	Fructose	Xylose	Mannitole	Starch
1	H1I1	-	+	+w	-	-	-	+	-	-
2	H1I7	+	+	+	+w	+	+w	+	-	-
3	H1I9	+	+	+w	-	+	-	+	-	+
4	H3I3	-	-	+w	-	-	+w	+	-	++
5	H3I4	-	+	+w	-	-	+w	+	-	+
6	H3I6	+	+	+	-	-	+	+	-	++
7	H3I9	+w	+	+w	-	+w	+w	+	+	++
8	H9I1	+	+	-	+	-	+	-	-	-
9	H13I2	+w	+w	-	-	-	-	+	-	-
10	H18I1	-	+w	-	-	+	-	-	-	-
11	H21I1	-	+w	-	-	-	-	+	-	-
12	H24I2	+	+	+	-	-	+	-	+	-
13	H25I1	-	+	+	-	+	+	+	-	-
14	H25I3	-	+	-	-	+	-	+	-	-
15	H25I4	-	-	-	-	-	-	+	+w	-
16	H28I1	-	+	-	-	-	-	+w	-	-
17	H29I2	-	+	-	-	-	+	+	+w	-
18	H30I1	-	-	-	-	-	+	+	-	-

٤. نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه پژوهش حاضر با روش‌های مبتنی بر کشت انجام شد، آنچه که از بررسی نتایج آن به دست می‌آید تنها در مورد گروه‌های قابل کشت دریاچه قابل بحث خواهد بود. بر این اساس و با در نظر گرفتن سهم کوچک میکروارگانیسم‌های قابل کشت در مقایسه با جامعه میکربی، همچنین با توجه به اینکه پیش از این، پژوهشی بر روی میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت دریاچه حوض سلطان انجام نگرفته است، مقایسه نتایج به دست آمده از نظر بازده روش‌های کشت به کار گرفته شده یا تعیین نقش گروه‌های میکربی جداسازی شده در حفظ عملکرد زیست‌بوم امکان‌پذیر نخواهد بود. تنوع میکربی مشاهده شده، با توجه به تفاوت اندازه‌های فیزیکی میکروارگانیسم‌ها با ابعاد مورد مطالعه در پژوهش‌های بوم‌شناختی، تابعی از گستردگی فضاهای مورد بررسی و تعداد نمونه‌برداری است. به همین دلیل در بررسی‌های میکربی، حتی در روش‌های مستقل از کشت، بحث از تنوع شناسایی شده خواهد بود، ولی عمومیت دادن آن به تنوع موجود و جامعه اصلی میکربی از نظر آماری صحیح نمی‌باشد (۲۲).

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که دریاچه نمک حوض سلطان زیستگاه مناسبی برای میکروارگانیسم‌های نمک دوست که قادر به رشد در حضور غلظت بالای کلرید سدیم هستند، می‌باشد. در مقایسه با گزارشاتی که از سایر دریاچه‌های نمکی کشور (۲۳،۲۴،۲۵،۲۶،۲۷،۲۸) و دریاچه‌های نمکی خارج از کشور(۹، ۱۰، ۱۹، ۲۰،۲۱) با غلظت نمکی مشابه بدست آمده است، کلنی‌های باکتریایی و آرکی‌های رشد یافته از نمونه‌های بدست آمده از دریاچه حوض سلطان، بسیار متعدد و متنوع بودند. از طرف دیگر، علاوه بر وجود غلظت زیاد کلرید سدیم، وجود غلظت بالای منیزم و کلسیم در دریاچه نمک حوض سلطان نیز احتمالا شرایط مناسب‌تری را برای بقاء و حیات باکتری‌های نمک دوست فراهم کرده است.

از میان ۲۰۵ سویه جداسازی شده از دریاچه نمک حوض سلطان، اکثر سویه‌ها (تقریبا ۹۱% سویه‌ها)، میکروب‌های نمک دوست نسبی بوده (اپتیمم رشدشان در غلظت ۵-۱۵% نمک (۱ تا ۲/۵مولار)) که احتمالا متعلق به جنس‌های هالوباسیلوس [1] و سالینوکوکوس [2] می‌باشند (۷).

1. Halobacillus
2. Salinococcus

ولی تعداد کمی از سویه‌های جداسازی شده، حدود ۹% سویه‌ها (۱۸ سویه) متعلق به باکتری های نمک دوست اجباری و افراطی بودند که در محیط حاوی ۳۵%-۱۵ (۵/ ۲ تا ۶/۰ مولار) غلظت نمک رشد داشتند که بررسی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی نشان داد که سویه‌های جداسازی شده می‌توانند اغلب متعلق به جنس‌های هالوباکتریوم[1] (۴/۵-۳/۵ مولار)، هالوآرکئولا[2] (۳-۲ مولار)، هالوروبروم[3] (۴-۳مولار) و هالوکوکوس[4] (۴/۵- ۳/۵ مولار) متعلق به خانواده هالوباکتریاسه باشند (۳).

در مطالعه تنوع زیستی باکتری‌های تحمل‌کننده نمک دریاچه آران و بیدگل، جدایه‌های حاصل به جنس‌های مختلف *Marinilactibacillus*، *Oceanobacillus*، *Bacillus*، *Salinicoccus*، *Microbacterium*، *Pseudomonas*، *Halomonas* متعلق بودند که ۴۱ سویه در این مطالعه گزارش شد. اغلب جدایه‌ها نمک‌دوست نسبی بودند (۲۸،۲۳). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ بر روی جداسازی میکروارگانیسم‌ها از دریاچه ارومیه انجام شده است نیز میکروارگانیسم‌هایی گزارش شدند که بیشترین میزان شباهت را به جنس‌های *Halomonas*، *Salicola*، *Pseudomonas*، *Marinobacter*، *Bacillus* و *Halobacillus* نشان دادند (۲۵،۲۴).

در پژوهش حاضر، تنوع بسیار بالاتری در سطح سویه مشاهده شد که می‌توان آن را به تنوع محیط‌های جداسازی و حجم بالاتر کار نسبت داد. بیشتر سویه‌ها (تقریبا ۶۶% سویه‌ها) از گروه باسیل‌های گرم مثبت بودند، حال آن که تعداد سویه‌های گرم منفی این محیط شور (حدود۱۳% سویه‌ها)، نسبت به سایر محیط‌های شور در نقاط دیگر جهان فراوانی بیشتری داشت و تعداد کوکسی‌های جداسازی شده (حدود ۱۲% سویه‌ها) از این دریاچه نمکی در مقایسه با باسیل‌های جدا شده بسیار کمتر بود (۹، ۱۰، ۱۷، ۲۱).

نتایج حاصل از این پژوهش در مقایسه با مطالعات قبلی بر روی اکوسیستم‌های شور کشور به ویژه مطالعات آموزگار، پوربابایی، واحد، کفیل‌زاده و همکارانشان بر روی دریاچه‌های نمک آران و بیدگل و ارومیه و اینچه برون و بختگان از نظر فراوانی و تنوع باکتری‌های نمک دوست جدا شده

1. Halobacterium
2. Haloarcula
3. Halorubrum
4. Halococcus

مشابه بود. اما تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای نیز در آن مشاهده می‌شود (۲۳،۲۴،۲۵،۲۶،۲۷،۲۸).

تعداد و تنوع نمونه‌های به‌کار گرفته شده، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری، توزیع طبیعی میکروارگانیسم‌ها در محیط زیست و مشخصات بوم‌شناختی هر منطقه همگی از جمله مواردی هستند که در نوع باکتری‌های جداسازی شده اثر خواهند داشت (۲۹). احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش هر بار نمونه‌برداری نیز در تفاوت نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جدا شده در هر پژوهش تأثیرگذار خواهد بود (۲۲).

پس از اینکه مطالعات اکولوژیکی در این تحقیق در دریاچه نمک حوض سلطان منجر به جداسازی و شناسایی تعداد گسترده‌ای ازباکتری‌های نمک دوست افراطی (شدیدا نمک دوست) شد، توانایی آنها از نظر تولید آنزیم‌های هیدرولازی خارج سلولی نظیر آمیلاز، لیپاز، دی ان آز، اوره آز، گزیلاناز و ژلاتیناز مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد تعدادی از آنها توانایی تولید برخی آنزیم‌ها را دارا بودند. کشف و شناسایی چنین سویه‌هایی که توانایی تجزیه برخی ترکیبات و پلیمرهای زیستی را دارند، می‌تواند شرایط را برای تحقیقات بیشتر و دستیابی به دستاوردهای جدیدتر در زمینه بیوتکنولوژی و صنایع گوناگون فراهم سازد، زیرا فرآیندهای صنعتی معمولا تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی انجام می‌گیرند که غالباً مطلوب و بهینه فعالیت آنزیم‌هایی که امروزه استفاده می‌شود، نیست. به همین دلیل آنزیم‌هایی که بتوانند دارای بهینه فعالیت در شرایط سخت صنعتی از نظر دما و نمک باشند، اهمیت بسیار بالایی دارند و نمک دوست‌ها منبع احتمالی مناسب برای چنین آنزیم‌هایی هستند، در حقیقت آنزیم‌های به دست آمده از نمک دوست‌ها نه تنها به نمک تحمل داشته، بلکه بسیاری از آنها تحمل‌پذیر حرارت نیز می‌باشند. جداسازی سویه‌های نمک دوست قادر به تولید آنزیم‌های خارج سلولی این امکان را فراهم می‌کند که در غلظت‌های مختلف نمک فعالیت‌های بهینه همچنان امکان‌پذیر باشد.

نتایج بررسی‌ها نشان داد که سویه‌های منتخب (۱۸سویه شدیداً نمک دوست) در تولید آمیلاز و لیپاز از توانمندی بالایی برخوردارند، در حالی که در تولید آنزیم DNase و پروتئاز فعالیتی نداشتند و به نظر می‌رسد برخی از این سویه‌های نمک دوست جدا شده از خاک، لجن و شورابه دریاچه منبع مناسبی برای تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی نظیر گزیلاناز هستند (۵).

در بررسی‌های انجام یافته توسط آموزگار و همکارانش، نتایج مشابهی از سویه‌های جداسازی شده از دریاچه‌های ارومیه و آران و بیدگل مشاهده شد. اما در پژوهش‌های سانچز- پرو که بر روی

محیط‌های شور مختلف در جنوب اسپانیا انجام گرفت، چنین فعالیت‌های آنزیمی در سویه‌های آن منطقه مشاهده نشد. همچنین در مقایسه با تحقیقاتی که اینک و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی دریاچه نمک در رومانی انجام دادند، دریاچه حوض سلطان از تنوع میکروبی بالایی برخوردار می‌باشد که می‌تواند زمینه را برای تحقیقات بعدی در این منطقه مهیا نماید (۸، ۱۷).

از نظر تنوع زیستی و وجود جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتری‌های نمک دوست در دریاچه حوض سلطان، باید خاطر نشان کرد که تنوع گسترده‌ای از باکتری‌های تحمل کننده نمک، نمک دوست نسبی و نمک دوست اجباری در این اکوسیستم یافت شده است. لازم به ذکر است که در میان سویه‌های یافت شده در این زیستگاه، هیچ سویه غیر نمک دوست شناسایی نشد. همچنین این اکوسیستم، دریاچه‌ای فصلی است که در ماه‌های بارانی پر آب و در فصول گرم، خشک است و این مسئله می‌تواند توجیه مناسبی برای فقدان برخی سویه‌ها نظیر مارینوباکتر که در آب‌های شور یافت می‌شود، باشد (۷).

در واقع مطالعات زیستگاهی در محیط شور دریاچه حوض سلطان، منجر به جداسازی و شناسایی تنوعی از باکتری‌های نمک دوست نسبی شد. این یافته‌ها با بسیاری از نتایج به دست آمده از دیگر بررسی‌های انجام گرفته در زیستگاه‌های شور، تفاوت دارد، به عبارت دیگر در این پژوهش، جداسازی و شناسایی سویه‌های ارزشمندی انجام شد که در مقایسه با هم ارزهای نمک دوست خود در اکثر محیط‌های شور، متنوع‌تر بودند و کشف و شناسایی چنین سویه‌هایی می‌تواند افقی نو در زیست فناوری جدید ایجاد نماید.

References

1. Fendrihan S, Legat A, Pfaffenhuemer M, Gruber C, Weidler G, Gerbl F, Stan-Lotter H. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2006; 5: 203–218.
2. Dave SR, Desai HB. Microbial diversity at marine salterns near Bhavnagar, Gujarat, India. *Current Science*. 2016; 60(4): 497-500.
3. DasSharma S, Arora P. Halophiles, Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, 2011: 31-89.
4. Oren A. Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/ Boston/London, The Netherlands, 2003: 30–74.
5. Van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Ecol.ind. microbial*. 2013; 6: 213–218.
6. Wikipedia, the free encyclopedia, Namak Lake. 2017. http://en.wikipedia.org/wiki/Namak-Lake.
7. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria, Microbiol. *Mol. Biol. Rev*. 2012; 62: 504–544.
8. Enache M, Itoh T, Kamekura M, Teodosiu G, Dumitru L. Haloferax prahovense sp. nov. an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2007; 57: 393–397.
9. Gutiérrez MC, Castillo AM, Kamekura M, Xue Y, Ma Y, Cowan DA, Jones BE, Grant WD, Ventosa A. Halopiger xanaduensis gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline Lake Shangmatala in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2007; 57: 1402–1407.
10. Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl. Environ. Microbiol*. 2016; 72: 3832–3845.
11. Stan-Lotter H, Radax C, McGenity TJ, Legat A, Pfaffenhuemer M, Wieland H, Gruber C, Denner EBM. From intraterrestrials to extraterrestrials –viable haloarchaea in ancient salt deposits. In: text book of Halophilic microorganisms. edited by: Ventosa A, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2004: 89–102.
12. Grant WD, Kamekura M, McGenity TJ, Ventosa A. The order Halobacteriales. In: text book of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. edited by: DR Boone and RW Castenholz, 2thedition, 2011, 1: 294–334.
13. Murray RGE, Doetsch RN, Robinow CF. Determination and cytological light microscopy. In: text book of Method for General and molecular bacteriology. edited by: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. washington. DC: America society for microbiology, 2014: 121-141.
14. Cowan DA. Industrial enzymes in biotechnology. edited by: The science and the Business. eds Moses V, Cape RE. Reading; Harwood Academic Publishers, 2008: 311-340.
15. Onishi H, Mori T, Takechi S, Tani K, Kobayashi T, Kamekura M. Halophilic nuclease of a moderately halophilic bacillus sp: production, purification and characteristics. *Appl. Environ. Microbiol*. 2008; (45): 24-30.

16. Kamekura M. Extreme halophiles, In text book of The Biology of Halophilic Bacteria. edited by: Vreeland RH, Hochstein LI, Boca Raton: CRC Press, 2003: 135–161.
17. Sanchez-Porro C, Martin S, Mellado E, Ventosa A. Diversity of Moderately Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolytic Enzymes. *Appl.Microbiol*. 2003; 94: 295-300.
18. Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic Eubacteria. In: text book of Halophilic Bacteria. edited by: Rodriguez-Valera F, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 2008, 1: 109–138.
19. Norton CF, McGenity TJ, Grant WD. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *J.Gen.Microbiol.* 2013; 139: 1077–1081.
20. Post FJ. The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb.Ecol*. 2004; 3:143–165.
21. Yang Y, Cui HL, Zhou PJ, Liu SJ. Haloarcula amylolytica sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2007; 57: 103–106.
22. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(10): 4399-4406.
23. Babavalian H, Amoozegar M, Pourbabaei AA. Isolation, Identification and Characterization of moderately halophilic bacteria producing Hydrolytic enzymes from Aran-Bidgol salt Lake. *Iranian Journ of Biology*. 2009; 22(1): 24-45.
24. Mehrshad M, Amoozegar M, Yakhchali B, Shahzedeh Fazeli A. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. Biological Journal of Microorganisms. 2012; 1(2): 49-70.
25. Zununi Vahed S, Forouhandeh H, Hassanzadeh S, Klenk H, Hejazi MA, Hejazi MS. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. *Microbiology*. 2011; 80(6): 834–841.
26. Kafilzadeh F, Javid H, Kargar M. Isolation of Halophilic and Halotolerant Microorganisms from the Bakhtegan Lake and the Effect of Physicochemical Factors on Their Frequency. *Journal of water and wastewater*. 2007; 18(3): 81-87.
27. Zarparvar P, Amoozegar M, Fallahian M. Diversity of culturable Moderate halophilic and Halotolerant Bacteria in Incheh Boroun hyper saline wetland in Iran. *Iranian Journal of Cellular and Molecular Researches.* 2014; 1: 44-56.
28. Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pašić L, Ventosa A. Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes Environ*. 2011; 27(1): 87-93.
29. Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*. 2009; 13(4): 583-594.

استناد به این مقاله:
محمودنیا، فهیمه (۱۳۹۹). مطالعه تعیین ویژگی‌های آنزیمی باکتری‌های شدیدا نمک‌دوست جداسازی شده از دریاچه حوض سلطان. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۰، شماره ۳۸، ص ۷۷-۹۴.