جداسازی و تشخیص دو گونه استافیلوکوس از آب‌های شور استان گلستان

الهام خواستار[۱]
آیلر جمالی[۲]
فرهاد نیک نژاد[۳*]

۱. کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.
۲. استادیار گروه میکرب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۳. استادیار گروه قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

***مسئول مکاتبات:**
fniknezhad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۹
کد مقاله : ۱۳۹۷۰۱۰۴۴۶
این مقاله برگرفته ازپایان نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

دریاچه‌های شور با محدوده شوری نزدیک به آب دریا، محیط‌های پرشور بوده اما اغلب دارای طیف وسیعی از عوامل میکروبی می‌باشند. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های هالوفیل و بی‌نهایت هالوفیل از آب‌های شور اینچه‌برون، آلماگل، آجی گل با دو روش بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین مقایسه کارایی این دو روش می‌باشد. سال ۱۳۹۴، از ۳ دریاچه اینچه برون، آلماگل و آجی گل، تعداد ۵۱ نمونه (هرکدام ۱۷ نمونه) از مناطق مختلف با EC و pH متفاوت جمع‌آوری شد. این ایزوله‌ها بر روی محیط کشت انتخابی Saline nutrient broth کشت داده شدند. ایزوله‌ها براساس مورفولوژی کلنی و سلول بررسی شدند. مورفولوژی کلنی‌ها با تأکید بر تولید پیگمان، اندازه کلنی و کدورت تعیین شدند. این خصوصیات از طریق رشد کشت‌ها در EC، pH و غلظت نمک اپتیمم انجام شد. تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، ژلاتیناز، آمیلاز، اکسیداز، سیترات، اوره آز، ایندول، وژسپروسکوئر، تخمیر اکسیداسیون (لاکتوز، سوکرز، دکستروز) و روش مولکولی (PCR ژن کروموزومی tuf) انجام شد. براساس تست‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی تعداد ۲۰ ایزوله هالوفیل و بی‌نهایت هالوفیل از آب‌های شور اینچه برون، آلماگل، آجی گل جداسازی شد که فراوان‌ترین گونه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* با ۹ مورد، پس‌ازآن استافیلوکوکوس کپیتیس مشاهده شد. با مقایسه روش بیوشیمیایی و مولکولی مشاهده شد که تست‌های بیوشیمیایی در ۹ مورد قادر به تشخیص گونه نبودند و بر این اساس، روش مولکولی به نسبت روش بیوشیمیایی از کارایی بالاتری برخوردار می‌باشد. محیط‌های پرشور به علت سختی شرایط زندگی، از تنوع زیستی کمتری نسبت به محیط‌های معتدل برخوردارند؛ اما ازنظر حضور میکروارگانیسم‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک، تنوع بالایی دارند و انواعی از نمک دوست‌های نسبی و تحمل‌کننده‌های نمک در این محیط‌ها وجود دارند.

واژگان کلیدی: اینچه برون، آجی گل، آلماگل، tuf، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استافیلوکوکوس کپیتیس.

مقدمه

هالوفیل‌ها ارگانیسم‌های نمک دوستی می‌باشند که در محیط‌های بسیار نمکی زندگی می‌کنند. هالوفیل‌ها عمدتاً شامل میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی با ظرفیت ایجاد توازن در فشار اسمزی محیط و مقاومت به اثرات دناتوره کنندگی نمک‌ها می‌باشند. در بین میکروارگانیسم‌های هالوفیل، تنوعی از آرکی‌های هتروتروف و متانوژنیک؛ باکتری‌های فتوسنتتیک، لیتوتروف و هتروتروف؛ و یوکاریوت‌های فتوسنتتیک و هتروتروفیک مشاهده می‌شوند. نمونه‌ای از میکروارگانیسم‌های هالوفیل با انتشار وسیع و سازگاری خوب شامل گونه‌های آرکی هالوباکتریوم، سیانوباکتریایی مانند *Aphanothece halophytica* و جلبک سبز *Dunaliella salina* می‌باشد. در بین یوکاریوت‌های چندسلولی، گونه‌هایی از میگو آب‌شور و مگس آب‌شور معمولاً محیط‌های بسیار شور یافت شده‌اند (Arora and *et al*., 2014).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

باکتری هالوفیل پتانسیل بالایی برای فعالیت‌های زیست فن‌آورانه برای حداقل دو دلیل دارند: ۱. فعالیت‌های آن‌ها در محیط‌های طبیعی با توجه به مشارکت آن‌ها در پروسه‌های بیوشیمیایی C، N، S و P، تشکیل و انحلال کربنات‌ها، ایموبیلیزاسیون فسفات‌ها و تولید فاکتورهای رشد و مواد مغذی می‌باشد و ۲. نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها ساده می‌باشند. اکثراً می‌توانند از طیف وسیعی از ترکیبات به‌عنوان مخزن انرژی و کربن استفاده کنند. بیشتر آن‌ها می‌توانند در غلظت‌های بالای نمک رشد کرده و خطر آلودگی را کاهش دهند. علاوه براین، چندین ابزار ژنتیکی برای باکتری‌های غیرهالوفیل گسترش‌یافته که می‌تواند برای هالوفیل ها بکار گرفته شوند و بدین ترتیب دستکاری ژنتیکی آن‌ها امکان‌پذیر می‌باشد (Wackett and *et al*., 2012).

هالوفیل‌ها در بین سیانوباکتری ها، شاخه فلاووباکتریوم- سیتوفاگا، اسپیروکت‌ها و اکتینومایست‌ها یافت می‌شود. در دودمان باکتری‌های گرم مثبت (Firmicutes)، هالوفیل ها در هر دوشاخه باکتری‌های هوازی (باسیلوس و ارگانیسم‌های وابسته) و همچنین بی‌هوازی یافت می‌شود. به‌طورکلی، این‌طور بیان می‌شود که انواع باکتریایی نسبت به انواع دیگر بی‌نهایت نمک دوست‌ها، متوسط می‌باشند(Jacob and *et al*., 2012).

مهرشاد و همکاران در سال ۱۳۹۱، تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه را موردمطالعه قراردادند. درروش مبتنی بر کشت، باکتری‌های نمک دوست و دارای تحمل نسبت به وجود نمک در شرایط هوازی در چهار محیط کشت MH، SWN، SWNLN و MHLN جداسازی شدند. جدایه‌ها بر اساس تفاوت‌های کلونی، واکنش گرم، رنگ‌آمیزی اسپور و ویژگی‌های بیوشیمیایی اولیه تفکیک شدند (Mehrshad and *et al*., 2012).

زرپرور و همکاران در سال ۱۳۹۳، بررسی تنوع زیستی باکتری‌های نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک قابل‌کشت در تالاب پرشور اینچه برون را انجام دادند. تالاب اینچه برون در شمال ایران در نزدیکی مرز ترکمنستان واقع‌شده و شوری و تغییرات pH آن قابل‌توجه است. در شهریور ۱۳۸۹ از آب، خاک و نمک ۴ منطقه تالاب نمونه‌برداری شد. ۴۰۰ جدایه خالص‌سازی و ۵۵ سویه PCR گردید (Zarparvar and *et al*., 2014).

استافیلوکوک ها سطوح بالایی از نمک را تحمل می‌کند. سویه‌های استافیلوکوک عموماً در ۱۰-۷ درصد نمک رشد می‌کنند. اما مقاومت تا ۲۰ درصد نمک در برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده‌شده است. به‌طورکلی فعالیت آبی (water activity) ۰/۸۶ به‌عنوان محدوده رشد استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته می‌شود. در طی فشار اسمزی، استافیلوکوک ها فشار تورگر را از طریق افزایش غلظت محلول‌های رقابتی در سیتوپلاسم، افزایش می‌دهند. گلایسین بتائین و پرولین محلول‌های رقابتی اصلی در استافیلوکوکوس اورئوس هستند. همچنین در طی فشار اسمزی بالا تولید توکسین متوقف می‌شود. بیوفیلم نیز در طی فشارهای محیطی، ممکن است از باکتری محافظت کند. سدیم کلراید تشکیل بیوفیلم را در استافیلوکوک ها افزایش می‌دهد. همچنین بیان ژن‌های ica توسط سدیم کلراید القاء می‌شود. ژن rbf یک پروتئین ۸۰ کیلودالتونی را کد می‌کند که توسط سدیم کلراید القاء می‌شود و یک تنظیم‌کننده مهم برای القاء تشکیل بیوفیلم توسط نمک و گلوکز می‌باشد (Rode and *et al*., 2012).

تالاب اینچه برون در شمال ایران در نزدیکی مرز ترکمنستان واقع‌شده و شوری و تغییرات pH آن قابل‌توجه است. آلاگل، آلماگل و آجی گل سه تالاب بین‌المللی بخش مرزی داشلی برون گنبدکاووس می‌باشند. برای رسیدن به این تالاب‌ها باید مسیر ۸۰ کیلومتری را از شهر گنبدکاووس تا بخش مرزی داشلی برون طی کرد. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری های نمک دوست و متحمل نمک از آب‌های شور اینچه برون، آلماگل، آجی گل با دو روش بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین مقایسه کارایی این دو روش می‌باشد.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری به مدت ۴ ماه (هفته‌ای یکبار)، از بهمن‌ماه سال ۱۳۹۳ تا اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۴ از مناطق مختلف با EC و pH متفاوت دریاچه‌های اینچه برون و آلماگل (از نقاط عمیق) و آجی گل (از محل کم‌عمق به علت باتلاقی بودن تالاب) جداسازی شد. تعداد ۱۷ نمونه از دریاچه اینچه برون،۱۷ نمونه از آلماگل و ۱۷ نمونه از آجی گل از سطوح، EC و pH متفاوت جمع‌آوری شد. این ایزوله‌ها بر روی محیط کشت انتخابی Saline nutrient broth رشد کرده و شوند و پس از گذشت ۷ روز، بر روی محیط کشت نوترینت آگار ۱۰ درصد کشت داده شدند. برای تشخیص بیشتر انتخاب شدند. نمونه‌ها براساس مورفولوژی کلنی‌ها و سلول در رنگ‌آمیزی گرم، بررسی شدند. مورفولوژی کلنی با تأکید بر تولید پیگمان، اندازه کلنی و کدورت تعیین شدند. این خصوصیات از طریق رشد کشت‌ها در EC، pH و غلظت نمک اپتیمم انجام شد. رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، ژلاتیناز، آمیلاز، اکسیداز، سیترات، اوره آز، ایندول، وژسپروسکوئر، تخمیر/اکسیداسیون (لاکتوز، سوکرز، دکستروز) انجام شد. در رنگ‌آمیزی گرم کوکسی های گرم مثبت خوشه‌ای مشاهده شدند (Azhar, 2014).

تست کاتالاز: از کشت نمونه بر روی لام حاوی ۳ درصد پراکسید هیدروژن قرار داده شد. ظهور حباب نشان‌دهنده واکنش مثبت بوده و حضور آنزیم کاتالاز تایید می‌شود. اگر گاز تولید نشود، این واکنش منفی می‌باشد (Azhar, 2014).

تست آمیلاز: در این تست، ایزوله‌ها بر روی پلیت Starch agar تلقیح و در ۳۷ درجه برای ۲ روز انکوبه می‌شوند. بعد از انکوباسیون، محلول یدی بر روی آگار ریخته شده و هیدرولیز نشاسته از طریق بررسی ناحیه فاقد رشد، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Azhar, 2014).

مایع سازی ژلاتین: ژلاتین پروتئینی ست که از طریق هیدرولیز کلاژن تولید می‌شود. هیدرولیز ژلاتین توسط میکروارگانیسم هایی که قادر به تولید اگزوآنزیم پروتئولیتیک بنام ژلاتیناز هستند، انجام می‌شود. تجزیه نشاسته در محیط کشت توسط یک اگزوآنزیم انجام‌شده که می‌تواند از طریق مشاهده مایع شدن ژلاتین تعیین شود (از طریق روان شدن محیط کشت ژلاتین آگار با محلول مرکوریک کلراید و مشاهده ناحیه شفاف خط رشد) زیرا ژلاتین با مواد شیمیایی رسوب‌کرده و تشکیل پروتئین کوآگوله می‌دهد اما محصول انتهایی تجزیه (آمینواسیدها) توسط همان مواد شیمیایی رسوب نمی‌کند (Azhar, 2014).

تست اوره آز: این تست از طریق رشد ارگانیسم بر روی محیط کشت اوره براث یا اوره آگار حاوی ایندیکاتور pH فنل‌رد (pH 6.8) انجام شد. در طول انکوباسیون، میکروارگانیسم های دارای اوره آز، تولید آمونیاک کرده که pH محیط کشت را بالا می‌برد. در pH بالاتر، فنل رد از زرد (pH برابر با ۶/۸) به قرمز صورتی پررنگ تغییر می‌کند. عدم‌تغییر رنگ، نشان‌دهنده فقدان تولید آنزیم اوره آز می‌باشد (Azhar, 2014).

تست اکسیداز: تست اکسیداز یک تست استفاده شده در میکروبیولوژی به‌منظور تعیین باکتری‌های تولیدکننده سیتوکروم c اکسیداز استفاده می‌شود. در این تست از دیسک‌های آغشته به موادی مانند N-N-N’-N’- tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) یا N,N- dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) استفاده می‌شود که ایندیکاتور ردوکس (اکسایش کاهش) می باشد. این ایندیکاتور هنگامی‌که اکسید می‌شود سیاه- آبی تا مارون (خرمایی) و هنگامی‌که احیاء می‌شود، بی‌رنگ می‌گردد. باکتری اکسیداز مثبت، دارای سیتوکروم اکسیداز با ایندوفنول اکسیداز (یک هموپروتئین حاوی آهن) می‌باشند. هر دوی این آنزیم‌ها، انتقال الکترون‌ها از ترکیب دهنده (NADH) به پذیرنده الکترون (معمولاً اکسیژن) را کاتالیز می‌کنند. معرف تست، TMPD dihydrochloride به‌عنوان یک الکترون دهنده مصنوعی برای آنزیم اکسیداز استفاده می‌شود. معرف اکسیدشده موجب ایجاد رنگ آبی ترکیب ایندوفنول می‌شود. سیستم سایتوکرومی معمولاً فقط در ارگانیسم‌های هوازی وجود دارد که می‌توانند از اکسیژن به‌عنوان پذیرنده‌های نهایی هیدروژن استفاده کنند. محصول انتهایی این متابولیسم آب یا پراکسیدهیدروژن (که توسط کاتالاز می‌شکند) می‌باشد. باکتری زنده کشت داده‌شده بر روی Trypticase soy agar ممکن است با استفاده از یک تکنیک استریل از طریق تلقیح خطی فراهم شود. پلیت های تلقیح شده در ۳۷ درجه برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت برای کلنی‌های پایدار انکوبه

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

می‌شوند. باکتری‌های تازه تولیدشده، استفاده می‌شوند. سپس کلنی‌ها بر روی محیط کشت رشد کرده، ۲ تا ۳ قطره از معرف DMPD به سطح هر ارگانیسم، استفاده می‌شود. واکنش مثبت (+OX) به‌صورت تغییر رنگ از بنفش به ارغوانی طی ۱۰ تا ۳۰ ثانیه مشاهده می‌شود. واکنش منفی (-OX) به‌صورت صورتی کمرنگ یا عدم مشاهده رنگ گزارش می‌گردد (Azhar, 2014).

تست ایندول: تریپتوفان یک آمینواسید ضروری ست که می‌تواند از طریق فعالیت آنزیمی باکتری‌ها، اکسید شود و به محصولات متابولیکی (ایندول، پیرویک اسید و آمونیاک) تبدیل شود که حد واسط‌های آنزیم تریپتوفاناز می‌باشد. حضور ایندول از طریق افزودن معرف Kovac تعیین می‌شود که ایجاد رنگ قرمز آلبالویی می‌کند. رنگ توسط معرف تولید می‌شود که متشکل از p-dimethylaminobenzaldehyde می‌کند که ایجاد رنگ قرمز آلبالویی می‌کند. عدم ایجاد رنگ قرمز نشان‌دهنده این است که سوبسترای تریپتوفان هیدرولیز نشده و واکنش ایندول منفی خواهد بود (Azhar, 2014).

تست Methyl red: تمام میکروارگانیسم های روده‌ای گلوکز را تخمیر کرده و تولید اسیدهای آلی می‌کند. نامه‌نما متیل رد استفاده‌شده در این تست، محدوده pH حدود ۴ قرمز شده که نشان‌دهنده واکنش مثبت می‌باشد. در pH برابر با ۶، هنوز نشان‌دهنده اسید بوده اما غلظت یون هیدروژن کمتر بوده که ایندیکاتور زرد شده و واکنش منفی می‌باشد (Azhar, 2014).

تست Voges Proskauer: این تست توانایی بعضی از میکروارگانیسم ها در تولید محصول انتهایی غیر اسیدی یا خنثی مانند استیل متیل کربینول از اسیدهای آلی حاصل از متابولیسم گلوکز را نشان می‌دهد. معرف استفاده‌شده در این تست، معرف Baritt حاوی مخلوطی از محلول‌های آلفا- نفتول الکلی و پتاسیم هیدروکسید می‌باشد. تعیین استیل متیل کربینول، به اکسیده شدن محصول انتهایی به یک ترکیب دی استیل نیاز دارد. این واکنش در حضور کاتالیست آلفا- نفتول و یک گروه گوآنیدین که در پپتون محیط کشت MR-VP وجود دارد، رخ می‌دهد. درنتیجه، یک کمپلکس صورتی تشکیل می‌شود و ایجاد یکرنگ گل رز ایجاد می‌کند (Azhar, 2014).

تست مصرف سیترات: در غیاب گلوکز تخمیرپذیر یا لاکتوز، بعضی از میکروارگانیسم‌ها قادر به استفاده از سیترات به‌عنوان منبع کربن برای انرژی هستند. این توانایی به حضور سیترات پرمه آز وابسته است که انتقال سیترات به سلول را تسهیل می‌کند. در طی این واکنش، محیط قلیایی شده؛ دی‌اکسید کربن در ترکیب با آب و سدیم، تشکیل کربنات سدیم می‌دهد که یک ترکیب قلیایی می‌کند. حضور کربنات ایندیکاتور Bromomethyl blue تغییر داده و منجر به تغییر محیط کشت از سبز به آبی پروسی می‌شود. بعد از انکوباسیون کشت مثبت سیترات از طریق حضور رشد بر روی سطح اسلنت که با ایجاد رنگ آبی همراه ست، تشخیص داده می‌شود. واکنش منفی سیترات با عدم رشد و عدم‌تغییر رنگ محیط (سبز باقی می‌ماند) مشخص می‌شود (Azhar, 2014).

تخمیر کربوهیدرات: تخمیر کربوهیدرات‌ها (گلوکز، سوکروز و لاکتوز) توسط میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط بی‌هوازی لوله دورهام که برای به دام انداختن حباب‌های حاصل از تولید گاز به‌طور وارونه قرارگرفته انجام می‌شود. براث تخمیری حاوی مواد نوترینت براث، یک کربوهیدرات ویژه و ایندیکاتور pH (فنل رد) می‌باشد که این اندیکاتور در pH خنثی (۷) بوده و در pH برابر با ۶/۸ ناشی از تولید اسیدهای آلی، ایجاد رنگ زرد می‌کند (Azhar, 2014).

رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد w/v) بر روی نوترینت براث در pH برابر با ۷/۵ آزمایش می‌شود. رشد توسط کدورت در OD_{600} با استفاده از روش اسپکتروسکوپی مشخص می‌شود. ایزوله‌هایی که در غلظت ۱۵-۳ درصد از NaCl رشد می‌کنند، به‌عنوان سویه‌های هالوفیل متوسط شناخته می‌شوند. اما سویه‌هایی که در غلظت ۲۵-۱۵ درصد از NaCl رشد می‌کنند به‌عنوان اکسترم هالوفیل می‌باشند (Rohban, 2009).

رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد w/v) بر روی نوترینت براث در pH برابر با ۷/۵ آزمایش و رشد توسط کدورت در OD600 با استفاده از روش اسپکتروسکوپی (Ependorf, Germany) مشخص شد. ایزوله‌هایی که در غلظت ۱۵-۳ درصد از

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

NaCl رشد کردند، به‌عنوان سویه‌های هالوفیل متوسط اما سویه‌هایی که در غلظت ۲۵-۱۵٪ از NaCl رشد نمودند، به‌عنوان اکسترم هالوفیل شناخته شدند (Rohban and et al, 2009).

سپس به‌منظور آنالیز PCR ژن tuf مختص به جنس، استخراج DNA برای باکتری‌های گرم مثبت به روش لیزوزیم و برای ارگانیسم‌های گرم منفی با روش جوشاندن انجام شد. برای اطمینان از استخراج DNA، ۱۰ میکرولیتر از آن را در ژل الکتروفورز ۱ درصد قرار داده و وجود باند در ژل داکت ارزیابی شد. اگر نمونه فاقد باند بود یا باند ضعیفی مشاهده می‌شد، استخراج مجدداً تکرار می‌گردید. با استفاده از DNA ی ژنومی استخراج‌شده، ژن tuf با استفاده از پرایمر طراحی‌شده توسط Hwang و همکاران انجام‌شده که شامل توالی فورورد 5′- GCCAGTTGAGGACGTATTCT -3′ و پرایمر ریورس 3′- CCATTTCAGTACCTTCTGGTAA -5′ می‌باشد. واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، dNTP به مقدار ۲/۵ میلی مولار، Taq polymerase به مقدار ۰/۶ U، بافر ۲/۵ میکرولیتر و ۱۵ میلی مولار MgCl2 انجام شد. سیکل دمایی و زمانی ترموسایکلر (Peqlab, USA) در جدول ۱ نشان داده‌شده است (Hwang and *et al*., 2011).

جدول۱: برنامه دمایی و زمانی ترموسایکلر.

Secondary Extention	Primary Extention	Annealing	Secondary Denaturation	Primary Denaturation
	35			
72°C 10 min	72°C 45sec	56°C 30sec	95°C 30sec	95°C 15 min

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. محصول PCR در ناحیه bp ۴۱۲ برای تائید نتایج به‌دست‌آمده از تست‌های بیوشیمیایی، برای سکوئنسینگ به شرکت پیشگام ارسال گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی در سایت NCBI بلاست شد و براساس آن تعیین گونه انجام شد.

نتایج

به‌منظور شناسایی ایزوله‌ها ابتدا از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، آمیلاز، ژلاتیناز، اکسیداز، اوره آز، IMViC و تخمیر کربوهیدرات استفاده شد که نتایج تست‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم در جدول ۲ نشان داده‌شده است.

جدول۲: نتایج تست‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم.

نمونه	رنگ‌آمیزی گرم	کاتالاز	آمیلاز	ژلاتیناز	اکسیداز	اوره آز	IMViC	تخمیر کربوهیدرات	باکتری تشخیصی
۷۲	+	+	V	_	−		V	+−	*NR staph*
۸۶	+	+	+	+	−		--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۰۳	+	+	V	-	-	+	V	+-	**NR staph*
۱۰۴	+	+	V	-	-	+	V	+	*NR staph*
۱۱۰	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۱۵	+	+	V	-	-	+	V	+-	*NR staph*
۱۱۷	+	+	V	-	-	+	V	+-	*NR staph*
۱۱۸	+	+	V	-	-	+	V	+	*NR staph*

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

نمونه	رنگ‌آمیزی گرم	کاتالاز	آمیلاز	ژلاتیناز	اکسیداز	اوره آز	IMViC	تخمیر کربوهیدرات	باکتری تشخیصی
۱۲۰	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۲۳	+	+	+	+	−	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۲۴	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۲۵	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۲۶	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۲۹	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۷۴	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۷۷	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۸۱	+	+	+	+	-	+	--+-	+	*Staph.epidermidis*
۱۹۴	+	+	V	-	-		--+-	+-	*NR staph*
۲۳۸	+	+	V	-	-	+	--+-	+	*NR staph*
۲۳۹	+	+	V	-	-	+	--+-	+	*NR staph*

*NR: Non-Recognized

بعد از انجام تست‌های بیوشیمیایی PCR ژن tuf انجام شد. که بعد از تعیین توالی، در سایت NCBI، بلاست شدند. نتایج حاصل از بلاست در جدول ۳ آورده شده است.

جدول۳: نتایج حاصل از بلاست.

نمونه	نتیجه‌ی بلاست
۷۲	*Staph. capitis*
۸۶	*Staph.epidermidis*
۱۰۳	*Staph. capitis*
۱۰۴	*Staph.hominis*
۱۱۰	*Staph.epidermidis*
۱۱۵	*Staph.capitis*
۱۱۷	*Staph.capitis*
۱۱۸	*Staph.hominis*
۱۲۰	*Staph.epidermidis*
۱۲۳	*Staph.epidermidis*
۱۲۴	*Staph.epidermidis*
۱۲۵	*Staph.epidermidis*
۱۲۶	*Staph.epidermidis*
۱۲۹	*Staph.epidermidis*
۱۷۴	*Staph.epidermidis*
۱۷۷	*Staph.epidermidis*
۱۸۱	*Staph.epidermidis*

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

Staph.capitis	۱۹۴
Staph.hominis	۲۳۸
Staph.xylosus	۲۳۹

براین اساس از ۲۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۱۱ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۵۵ درصد موارد)، ۵ نمونه استافیلوکوکوس کپیتیس (۲۵ درصد موارد)، ۳ نمونه استافیلوکوکوس هومینیس (۱۵درصد موارد) و ۱ نمونه استافیلوکوکوس زایلوسوس (۵ درصد موارد) بوده است. بنابراین با مقایسه روش بیوشیمیایی و مولکولی مشاهده شد که تست‌های بیوشیمیایی در ۹ مورد (۴۵ درصد موارد) قادر به تشخیص گونه نبودند. بنابراین، روش مولکولی به نسبت روش بیوشیمیایی از کارایی بالاتری برخوردار می‌باشد و تفاوت معنی‌داری در استفاده از روش مولکولی نسبت به روش بیوشیمیایی وجود دارد ($P<۰/۰۵$) جدول ۴ مقایسه‌ی نتایج حاصل از روش بیوشیمیایی و مولکولی را نشان می‌دهد.

بنابراین *Staphylococcus epidermidis* با ۱۱ مورد فراوان‌ترین گونه شناخته‌شده بوده و پس‌ازآن *Staph.capitis* با ۵ مورد فراوان‌ترین گونه موردبررسی بود.

جدول٤: مقایسه نتایج تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی.

نمونه	نتیجه‌ی تست‌های بیوشیمیایی	نتیجه‌ی تعیین توالی ژن tuf
۷۲	*NR staph*	*Staph. Capitis*
۸۶	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۰۳	*NR staph*	*Staph. Capitis*
۱۰۴	*NR staph*	*Staph.hominis*
۱۱۰	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۱۵	*NR staph*	*Staph.capitis*
۱۱۷	*NR staph*	*Staph.capitis*
۱۱۸	*NR staph*	*Staph.hominis*
۱۲۰	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۲۳	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۲۴	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۲۵	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۲۶	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۲۹	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۷۴	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۷۷	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۸۱	*Staph.epidermidis*	*Staph.epidermidis*
۱۹۴	*NR staph*	*Staph.capitis*
۲۳۸	*NR staph*	*Staph.hominis*
۲۳۹	*NR staph*	*Staph.xylosus*

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی اخیر، در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۳ بر روی دریاچه‌های اینچه برون و آلماگل و آجی گل انجام شد. این مطالعه بر روی ۵۱ نمونه انجام گرفت که ۲۰ نمونه خالص‌سازی شد؛ که از این تعداد ۲ عدد هالوفیل و ۲۰ عدد اکسترم هالوفیل و هالوفیل خیلی شدید بودند. پس از انجام PCR مشخص شد که فراوان‌ترین گونه‌ها به ترتیب شامل *Staph epidermidis* و *Staph capitis* و *Staph hominis* و *Staph xylosus* بودند که در ۱۷ مورد میزان ترادف ژنی ۹۸ تا ۱۰۰ درصد بوده و در سه مورد ۹۵ تا ۹۶ درصد بوده و در دو مورد دیگر زیر ۹۵ درصد بوده است. روش قدرت تحمل ۷/۵ درصد نمک و تخمیر قند مانیتول است. برای این کار از محیط کشت مانیتول سالت اگار یا محیط کشت چاپمن استفاده می‌شود. این محیط دارای ۷/۵ درصد نمک قند مانتیول و معرف فنل رد بوده و به رنگ قرمز است. اگر باکتری قادر به تحمل ۷/۵ درصد نمک این محیط باشد رشد کرده کلنی ایجاد می‌کند. چنانچه باکتریی که در این محیط رشد می‌کند قادر به تخمیر مانیتول باشد با تولید اسید رنگ محیط را زرد می‌کند. استاف اورئوس علاوه بر رشد می‌تواند با تخمیر مانیتول تولید اسید کند که باعث کاهش pH می‌شود. در pH اسیدی فنل رد از قرمز به زرد تغییر رنگ می‌دهد .استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس قادر به تولید اسید نیستند، پس کلنی‌های قرمز تشکیل می‌دهند. این امر سبب افتراق اورئوس از ساپروفیتیکوس و اپیدرمیدیس می‌شود.

در مطالعه زرپرور و همکاران در سال ۱۳۹۳، جنس‌های *Bacillus* (۱۸ درصد)، *Marinobacter* (۱۶ درصد)، *Halomonas* (۱۶ درصد)، *Kocuria* (۹ درصد)، *Oceanobacillus* (۷درصد)، *Dietzia* (۷ درصد)،*Virgibacillus* (۶ درصد)، *Chromohalobacter* (۵ درصد)، *Rhodococcus* (۲ درصد)، *Micrococcus* (۳ درصد)، *Paenibacillus* (۲ درصد)، *Halobacillus* (۳ درصد)،*Thalassobacillus* (۲ درصد)، *Arthrobacter* (۲ درصد) و *Desmospora* (۲ درصد) جدا شدند. در ۱۳ سویه میزان شباهت در ترادف ژن 16S rRNA بین ۹۸/۴-۹۷ درصد و در ۷ سویه کمتر از ۹۷ درصد بود که بیانگر تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در سطح گونه و یا در برخی حتی جنس است. با بررسی بهینه رشد نمکی ۲۲ سویه نمک دوست نسبی ۳۳ سویه تحمل‌کننده نمک بودند (Zarparvar and *et al.*, 2014).

در مطالعه مهرشاد و همکاران در سال ۲۰۱۲، محتوای ژنومی نمونه‌های محیطی آب‌وخاک برای بررسی‌های مستقل از کشت استخراج شد. با استفاده از تکثیر 16S rRNA و کلونینگ کتابخانه ژن 16S rRNA تهیه و ۲۰ درصد کلون‌های نوترکیب حاصل تعیین ترادف شدند. از بین ۲۱۷ جدایه حاصل درروش مبتنی بر کشت ژن 16S rRNA برای ۵۲ سویه ترادف‌یابی شد که ازنظر فیلوژنتیک در جنس‌های *Halobacillus*، *Halomonas*، *Planococcus*، *Gracilibacillus*، *Bacillus*، *Pontibacillus*، *Paracoccus*، *Marinobacter*، *Providencia*، *Staphylococcus*، *Alkalibacterium*، *Sanguibacter*، *Lysobacter*، *Kocuria*، *Pontibacter*، *Salicola*، *Micrococcus*، *Oceanobacillus*، *Brevundimonas*، *Thalassobacillus*، *Microbacterium* و *Piscibacillus* قرارگرفتند. درروش مستقل از کشت کلون‌های بررسی‌شده در جنس‌های *Salinibacter*، *Adhaeribacter* و *Cesiribacter* قرارگرفتند. درروش مبتنی بر کشت بین جدایه‌های تعیین توالی شده ۱۸ جدایه شباهت کمتر از ۹۸/۷ درصد با سویه استاندارد نشان دادند که محدوده مرزی برای ارائه گونه جدید میکروبی بومی است. درروش مستقل از کشت کلون‌های بررسی‌شده در گروه Bacteroidetes قرارگرفتند؛ که مشابه با سایر گزارش‌های موجود در مورد محیط‌های پرشور بررسی‌شده است (Mehrshad and *et al*, 2012).

اخوان سپهی در سال ۱۳۹۳، سویه‌های جدیدی از باکتری نمک دوست *Salini vibrio* sp از دریاچه‌ی ارومیه را معرفی کردند. این پژوهش برای اولین بار شناسایی میکروارگانیسم نمک دوست نسبی جنس *Salini vibrio* از دریاچه‌ی شور ارومیه موردمطالعه قرار گرفت که منجر به شناسایی سویه‌های جدیدی از این جنس گردید. دریاچه‌ی ارومیه دریاچه‌ی پرشوری است که در شمال غربی ایران واقع‌شده و شورترین دریاچه‌ی دائمی ایران و از معدود دریاچه‌های فوق اشباع دائمی در جهان می‌باشد. ابتدا نمونه‌ها از مناطق مختلف دریاچه، جمع‌آوری و در شرایط

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از غنی‌سازی و کشت نمونه‌ها در شرایط تعریف‌شده، برای دستیابی به کلنی‌های خالص کشت‌های متوالی انجام گرفت. سپس سویه‌های منتخب ازنظر ویژگی‌های فنوتیپی و فیلوژنتیکی (به‌وسیله تکنیک توالی یابی 16S rRNA) موردمطالعه قرار گرفتند. از بین کل سویه‌های متعلق به *Salinivibrio* sp.، ۵۷ درصد و ۴۳ درصد سویه‌ها نزدیک‌ترین تشابه را به ترتیب به *S. costicola* subsp. *alcaliphilus* و *S. sharmensis* نشان دادند (Akhavan and *et al*., 2014).

Annapurna و همکاران در سال ۲۰۱۲، توانایی تولید پروتئاز هالوفیل‌های متوسط در دریاچه Sambhar و ساحل دریای Mumbai مورد ارزیابی قراردادند. توالی یابی مولکولی قارچ‌ها و باکتری‌ها با ارزیابی درخت فیلوژنتیکی حضور *Aspergillus flavus* در نمونه‌های ساحل دریای Mumbai و *Bacillus subtilis* در دریاچه Sambhar از Rajasthan را آشکار کرد. برای بررسی فعالیت پروتئازی، از سوبستراهای کازئین، لکه خون بر روی ابزار جراحی و مو استفاده شد. آنزیم‌ها توانایی حذف لکه خون از ابزار جراحی را نشان دادند. ایزوله‌های باسیلوس سوبتیلیس فعالیت اپتیمم در pH برابر با ۸ و دمای ۳۷ درجه و ۱۰ درصد NaCl با فعالیت پروتئازی بر روی کازئین و موی انسان داشتند؛ و همچنین *Aspergillus flavus* پایدار بوده و دارای فعالیت پروتئازی می‌باشند که می‌توانند از این آنزیم‌ها در تکنولوژی تولید مواد شوینده و پردازش چرم استفاده می‌شود (Annapurna and *et al*., 2012).

Asem و همکاران در سال ۲۰۱۴ تنوع زیستی دریاچه ارومیه را موردبررسی قراردادند. این دریاچه دارای میگوی آب‌شور بنام *Artemia urmiana* می‌باشد. علاوه براین دارای جلبک، باکتری، میکروقارچ، گیاهان، پرندگان و پستانداران می‌باشد. جمعیت میکروبی شامل: آرکی‌ها (جنس‌های *Haloarcula*، *Halobacterium*، *Haloferax* و *Halorubrum*) و باکتری‌ها (مثل میکروباکتریوم، نوستوک، آنابنا، باسیلوس لچینی فورمیس، *Halospina*، *Halomonas*، *Halovibrio* و ...) بوده است (Asem and *et al*., 2014). Rohban و همکاران در سال ۲۰۰۹، باکتری‌های هالوفیل تولیدکننده آنزیم‌های هیدرولیز خارج سلولی در دریاچه حوض سلطان را جدا کردند. مطالعه باکتری‌ها از نواحی مختلف پلایای حوض سلطان که یک دریاچه بسیار شور در ناحیه بیابان مرکزی ایران است که منجر به جداسازی ۲۳۱ باکتری هالوفیل متوسط (که قادر به رشد اپتیمم در محیط حاوی ۱۵-۵ درصد از نمک می‌شود) و ۴۹ میکروارگانیسم بی‌نهایت هالوفیل (که برای رشد اپتیمم به ۲۵-۲۰ درصد نمک نیاز دارند). این ایزوله‌ها تنوع وسیعی از آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی را تولید می‌کنند. تعداد ۱۹۵، ۱۷۷، ۱۰۰، ۹۵، ۹۲، ۶۸، ۶۵، ۳۳ و ۲۸ از سویه‌ها به ترتیب تولید لیپاز، آمیلاز، پروتئاز، اینولیناز، زایلاناز، سلولاز، پولولاناز، DNase و پکتیناز می‌کنند. در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، هالوفیل‌های میله‌ای گرم مثبت، فعالیت هالوفیلی بیشتری نشان می‌دهند. چندین فعالیت ترکیبی توسط بعضی از این ایزوله‌ها مشاهده شد. یک‌سویه ۹ فعالیت هیدرولیتیکی، ۴ سویه ۸ فعالیت هیدرولیتیکی، ۱۰ سویه ۷ فعالیت هیدرولیتیکی و ۲۹ سویه ۶ فعالیت هیدرولیتیکی را نشان می‌دهند. هیچ ایزوله هالوفیلی بدون فعالیت هیدرولیتیکی در این مطالعه یافت نشد. برطبق خصوصیات فنوتیپی و مقایسه جزئی آنالیز توالی 16S rRNA، سویه‌های هالوفیلی جنس‌های زیر مشخص شدند: *Salicola*، *Halovibrio*، *Halomonas*، *Oceanobacillus*، *Thalassobacillus*، *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Gracilibacillus*، *Salinicocus* و *Piscibacillus*. بیشترین تولیدکننده‌های لیپاز و DNase به ترتیب اعضایی از جنس *Gracilibacillus* و *Halomonas* بودند. به‌طوری‌که بیشترین ایزوله‌هایی که توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند آمیلاز، پروتئاز، سلولاز و اینولیناز متعلق به باکتری‌های گرم مثبت مانند *Gracili bacillus*، *Thalassobacillus*، *Virgibacillus* و *Halobacillus* بودند (Rohban and *et al*., 2009).

Cojoc و همکاران در سال ۲۰۰۹، آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی باکتری‌های هالوفیل جداشده از کریستال سنگ نمک قنات را موردبررسی قراردادند. تعداد کلنی‌های رشد یافته تقریباً ۳۰۰۰ در هر گرم از سنگ نمک بر روی سطح محیط کشت MH حاوی ۱۰ درصد از NaCl، تخمین زده شد. سویه‌های موردبررسی، به‌طور تصادفی از کلنی‌های مشاهده‌شده بر روی پلیت، انتخاب شدند و فعالیت آنزیمی هیدرولیتیک خارج سلولی آن‌ها بررسی شد و یک‌سویه از ۷ سوبسترای موردمطالعه، ۶ سوبسترا را هیدرولیز کردند. مطالعه آن‌ها نشان داد که

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

فعالیت هیدرولیتیکی برای توئین ۸۰ و کازئین، در بین سویه‌های جداشده در غلظت نمک بیش از ۲ مولار، غالب می‌شود. حضور فعالیت‌های هیدرولیتیکی ترکیبی در بعضی از سویه‌های جداشده می‌تواند برای استفاده در بعضی از فعالیت‌های بیوتکنولوژی در زمینه های مختلف صنعت یا کشاورزی مفید باشند (Cojoc and *et al*., 2009).

در مطالعه‌ی قاسمی و همکاران در سال ۲۰۱۰، بررسی توانایی تولید آمیلاز باکتری هالوفیل از دریاچه مهارلو در جنوب شرقی شیراز انجام شد. ۵۰ کلنی می‌توانند از نشاسته به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. تعیین فعالیت آمیلاز، تجزیه نشاسته با استفاده از روش‌های یدومتریک انجام‌شده است. در بین آن‌ها، ۱۳ سویه با بیشترین فعالیت آمیلازی توسط خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی و توالی 16S rRNA به‌عنوان مارکر مولکولی انجام شد. در این مطالعه باکتری *Rheinheimera aquimaris* BCCS 026 بالاترین توانایی تولید آمیلاز U/Ml ۶۱ نشان داد (Ghasemi and *et al*., 2010).

در سال ۲۰۱۱، Nayak و همکاران بر روی قارچ‌های هالوفیل در Goa در هند مطالعه کردند. قارچ‌های این دریاچه عمدتاً متعلق به جنس‌های آسپرژیلوس، تعدادی پنی سیلیوم و تعداد کمتری یوروتیوم و *Hortaea* بودند. بیشتر گونه‌ها هالوفیل اختیاری بودند. اما *A. penicillioides* هالوفیل اجباری بوده و تنها در حضور نمک قادر به رشد می‌باشد (Nayak and *et al*., 2012).

در این مطالعه مشاهده شد که تست‌های بیوشیمیایی در ۱۱ مورد قادر به تشخیص گونه نبودند و براین اساس، روش مولکولی به نسبت روش بیوشیمیایی از کارایی بالاتری برخوردار است. بنابراین در تشخیص گونه‌ها از روش مولکولی با کارایی بالاتری می‌توان استفاده کرد.

سپاسگزاری

با تشکر فراوان از اساتید و پرسنل محترم دانشگاه علوم پزشکی گلستان که ما را در انجام این تحقیق یاری رسزاندند. این تحقیق باهدف مقایسه دو روش بیوشیمیایی و مولکولی در شناسایی باکتری‌های هالوفیل و اکسترا هالوفیل سه دریاچه اینچه برون، آجی گل و آلماگل در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام شد.

منابع

Akhavan Sepahy, A., Irannejad, Sh., Amoozegar, M. A. and Tukmechi, A., 2014. The presentation of Novel Strains of Halophile Bacteria Salinivibrio sp. from Urmia Lake. Journal of Cellular and Molecular (Iranian Journal of Biology). 27 (3): 335- 345 (Persian).

Annapurna, S. A., Singh, A., Garg, S., Kumar, A. and Kumar, H., 2012. Screening, isolation and characterization protease producing moderately halophilic microorganisms. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences. 14 (4): 603- 612.

Arora, S., Vanza, M., Mehta, R., Bhuva, C. and Patel, P., 2014. Halophilic microbes for bio-remediation of salt affected soils. African Journal of Microbiology Research. 8 (33): 3070- 3078

Asem, A., Eimanifar, A., Djamali, M., Rios, P. and Wink, M., 2014. Biodiversity of the hypersaline lake national park (NW Iran). Diversity. 6: 102-132

Azhar, M., Uniyal, V., Chauhan, N. and Singh Rawat, D., 2014. Isolation and biochemical characterization of Halophiles from Sahastradhara region, Dehradun, India. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 3 (12): 753-760

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M. and Enache, M., 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal, Rom. Biotechnology Letters. 14: 4658–4664.

Ghasemi, Y., Amini, S., Ebrahimnezhad, A. and Zarrini, 2010. Halotolerant amylase production by a novel bacterial strain, Rheinheimera aquimaris. Research Journal of Microbiology. 5 (2): 144- 149

Hwang, S. M., Kim, M. S., Park, K. U., Song, J. and Kim, E. C., 2011. tuf Gene Sequence Analysis Has Greater Discriminatory Power than 16S rRNA Sequence Analysis in Identification of Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 49 (12): 4142–4149.

Jacob, J. H., 2012. Classification of Halophilic Heterotrophic Bacteria Thriving in the Jordanian Dead Sea Littoral Zone. Journal of Biological Sciences. 12: 246-252.

Mehrshad, M., Amoozegar, M. A., Yakhchali, B. and Shahzade Fazeli, S. A., 2012. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. Biological Journal of Microorganism. 1 (2): 49- 70 (Persian).

Nayak, S., Gonsalves, V. and Nazareth, S., 2012. Isolation and salt tolerance of halophilic fungi mangroves and solar salterns in Goa- India. Indian Journal of Geo-Marine Science. 41 (2): 146- 172

Rode, T. M., Moretro, T., Langsrud, S. and Holck, A., 2012. Responses of Staphylococcus aureus to environmental stresses. Nova Science Publishers, Inc. 509- 546

Rohban, R., Amoozegar, M. A. and Ventosa, A., 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 36: 333–340.

Wackett, L., 2012. Industrial applications of microbial salt-tolerant enzymes. Microbial Biotechnology. 5(5): 668–669.

Zarparvar, P., Amoozegar, M. E. and Fallahian, M., 2014. Diversity of culturable moderate halophilic and halotolerant bacteria in incheh boroun hyper saline wetland in Iran. Journal of Cellular and Molecular (Iranian Journal of Biology). 27 (1): 44-56 (Persian).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-25]