J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 36, pp. 13-18, 2006

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۳۶، صفحات ۱۸-۱۳، ۱۳۸۵

مطالعهٔ مقاومت هالوفراکس رادیوتولرانس، آرکی باکتری بسیار نمک‌دوست دریاچهٔ ارومیه در برابر پرتوهای فرابنفش و گامای کبالت ۶۰

عزت عسگرانی*[۱]، مهدیه شیرزاد[۱]، محمدرضا صعودی[۱]، حمیدرضا شاه‌محمدی[۲]، طاهره فلسفی[۱]
۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزّهرا(س)، تهران- ایران
۲- حوزه معاونت دانشجویی، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، صندوق پستی: ۱۵۱۳-۱۴۶۶۵، تهران- ایران

چکیده: در این پژوهش، میزان مقاومت یک آرکی باکتری بسیار نمک‌دوست جدا شده از دریاچهٔ ارومیه، هالوفراکس رادیوتولرانس، برای مقابله با اثرهای کشندهٔ پرتوهای فرابنفش و گامای کبالت ۶۰ مورد بررسی قرار گرفت. مقاومت این ارگانیسم در برابر عوامل آسیب‌رسان به DNA با سنجش کسر بقا در دوزهای مختلف پرتودهی با فرابنفش و گاما ارزیابی شد و با مقاومت اشرشیاکلی B/r که سویه‌ای مقاوم در برابر پرتودهی است، مقایسه شد. در آزمایش پرتودهی با نور فرابنفش، ارزش $D_{۳۷}$ برای هالوفراکس رادیوتولرانس و اشرشیاکلی B/r به ترتیب برابر با ۲۳۱ و ۹ $J/m^۲$ بود. ارزش $D_{۳۷}$ برای این دو باکتری، در پرتودهی گامای کبالت ۶۰ به ترتیب برابر با ۶۴۵ و ۹۹ گری بود. هالوفراکس رادیوتولرانس در برابر هر دو عامل، مقاومت بسیار بیشتری نسبت به اشرشیاکلی B/r از خود نشان می‌دهد. این نخستین گزارش در مورد مقاومت این عضو آرکی‌ها در برابر عوامل آسیب‌رسان به DNA می‌باشد.

***واژه‌های کلیدی:** آرکی باکتری، هالوفراکس رادیوتولرانس، پرتودهی، نورفرابنفش (UV)، پرتوهای گاما، ارزش $D_{۳۷}$، آسیب‌های DNA*

Study on the Resistance of Haloferax Radiotolerans, an Extreme Halophilic Archaebacterium from Uromia Lake Against Ultraviolet (UV) Light and ^{60}Co Gamma- Rays

E. Asgarani*[1], M. Shirzad[1], M.R. Soudi[1], H.R. Shahmohammadi[2], T. Falsafi[1]
1- Biology Dpt, Faculty of Science, Azzahra University, Tehran - Iran
2- Ministry of Science, Research and Technology, P.O. Box: 14665-1513, Tehran - Iran

Abstract: In this work, the capacity of an extreme halophilic archaebacterium, isolated from Uromia lake, Haloferax radiotolerans to withstand the lethal effects of ultraviolet light (UV),and ^{60}Co r-rays has heen studied. The resistibility of this organism against the DNA-damaging agents was evaluated by calculating of the survival fractions at different dose rates of UV and ^{60}Co r-rays radiations and compared with those of Escherichia coli B/r (a radioresistant strain of E. coli). D_{37} values for Haloferax radiotolerans and E. coli B/r were 231, and 9 J/m^2, respectively, by exposure to the UV light. They were 645, and 99 Gy, respectively, by exposure to ^{60}Co r-rays. Against these agents, Haloferax radiotolerans shows much more resistance compare to that of E. coli B/r. This is catogorized as the first report of resistibility in the member of Archaea.

Keywords: ***Archaebacteria, Haloferax Radiotolerans, Irradiation, Ultraviolet Light (UV), Gamma Rays, D_{37} Value, DNA Damages***

*email: asgarani@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۶/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۴/۱۱/۱۰

۱- مقدمه

هالوفراکس رادیوتولرانس ریزسازواره‌ای بسیار نمک‌دوست[۱] است که برای رشد بهینهٔ خود به ۲/۵ تا ۵ مولار کلریدسدیوم نیاز دارد. این باکتری به «آرکی‌ها»[۲] (گروهی از پروکاریوتها که دارای ویژگیهای مولکولی مشترک فراوانی با یوکاریوتها هستند) تعلّق دارد [۱]. امروزه، آرکی‌های بسیار نمک‌دوست در بسیاری از زمینه‌های بیوتکنولوژی، از جمله تجزیهٔ ترکیبات سمّی در آلودگی‌های نفتی، فاضلابهای شور و زباله‌های اتمی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲]. چنین کاربردهای منحصربفرد و سودمند، علاقمندی به شناسایی سویه‌ها و گونه‌های بومی را بوجود آورده است. این کار پژوهشی، به منظور یافتن گونهٔ بومی مقاوم به اثرهای کشندهٔ عوامل آسیب‌رسان به DNA صورت گرفت.

زیستگاه طبیعی هالوفراکس رادیوتولرانس، دریاچهٔ ارومیه بوده و دائماً در معرض تابش نور خورشید که حاوی پرتو فرابنفش است، قرار دارد. پرتو فرابنفش آسیبهایی را در DNA ایجاد می‌کند و موجب جهش‌های ژنتیکی، یا نابودی موجودات زنده می‌شود [۳]. هالوفراکس رادیوتولرانس در شرایط طبیعی چنین آسیب‌هایی را تحمل می‌کند، بنابراین، هدف اولیه این پژوهش بررسی مقاومت این سازواره در برابر پرتو فرابنفش است.

از طرف دیگر، یک باکتری بسیار مقاوم در برابر پرتودهی یون‌ساز به نام روبروباکتررادیوتولرانس، به دلیل وجود کارتنوئیدهایی که اساسی‌ترین آنها باکتریوروبرین است، رنگ قرمز شاخصی را نشان می‌دهد [۴]. باکتریوروبرین در باکتریهای نمک‌دوست، نظیر هالوباکتریوم سالیناروم [۵] و هالوفراکس مدیترانه‌ای نیز یافت شده است [۶]. نتایج کارهای پیشین ما نشان‌دهندهٔ مقاومت هالوباکتریوم سالیناروم در مقابل اثر کشندهٔ پرتو گاما بود [۴]. هالوفراکس رادیوتولرانس نیز رنگ قرمز شاخصی دارد، بنابراین هدف دیگر این تحقیق مطالعه و بررسی میزان مقاومت آرکی باکتری بسیار نمک‌دوست ایرانی در برابر پرتوهای یونساز است.

در هر دو مورد، پس از پرتودهی نمونه‌ها، نمودارهای بقا[۳] ترسیم شدند و مقدار ارزش $D_{۳۷}$[۴] بوسیلهٔ آنها بدست آمد [۷]. در نهایت مقاومت هالوفراکس رادیوتولرانس با اشرشیاکلی B/r (یک سویهٔ مقاوم به پرتودهی) مورد مقایسه قرار گرفت [۸].

شناخت سیستم‌های دفاعی، که با جلوگیری از ایجاد آسیب‌ها در DNA همچنین ساز و کار ترمیمی که با رفع اینگونه آسیبها در مجموع سبب مقاومت ریزسازواره‌ها در برابر عوامل آسیب‌رسان به DNA می‌گردند، به منظور یافتن سویه‌های بومی مقاوم اهمیت زیاد دارد، زیرا تجزیهٔ زباله‌های اتمی یکی از موارد استفاده از این سازواره‌ها می‌باشد که به آن نیاز داریم. تاکنون در زمینهٔ بررسی سازوکارهای مقاومت در برابر عوامل آسیب‌رسان به DNA در باکتری‌های نمک‌دوست هیچگونه مطالعه‌ای در کشور صورت نگرفته است. بنابراین، مشخص‌کردن مقاومت‌های این باکتری در برابر عواملی مانند پرتوهای فرابنفش و گاما و مقایسهٔ این مقاومت‌ها با مقاومت باکتری‌های دیگر به منظور مشخص شدن سیستم‌های دفاعی و ترمیمی که در ایجاد چنین مقاومتی دخالت دارند سودمند است.

۲- مواد و روش کار

۲-۱ باکتریها و شرایط رشد

برای رشد هالوفراکس رادیوتولرانس از محیط کشت غنی‌شده [۹] حاوی: ۲۰۰ گرم کلریدسدیوم، ۲۰ گرم کلریدپتاسیوم، ۲۰ گرم $MgSO_۴.۷H_۲O$، ۲/۳ میلی‌گرم $FeCl_۲.۴H_۲O$، ۳ گرم تری‌سیترات‌سدیوم، ۱۰ گرم عصارهٔ مخمّر، ۷/۵ گرم باکتو- کازآمینواسید و ۸/۳۳ میلی‌لیتر گلیسرول (۹۹/۵٪)، در یک لیتر آب مقطر (pH=۶/۸-۷/۲) در دمای $۳۷^{\circ}C$ استفاده شد. محیط کشت لوریا- برتانی (LB) نیز برای کشت اشرشیاکلی B/r در دمای $۳۷^{\circ}C$ مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲ تهیه سوسپانسیون سلولی

سلولهای هالوفراکس رادیوتولرانس در مرحله رشد لگاریتمی با انجام سانتریفیوژ در ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و پس از سه مرتبه شستشو با غلظتی برابر با $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. محلول ۲۰ درصد کلرید سدیوم برای شستشوی سلولها و شناور کردن آنها مورد استفاده قرار گرفت.

سلولهای اشرشیاکلی B/r نیز در $۳۷^{\circ}C$ رشد داده شدند، سپس با روش پیش‌گفته شناور گردیدند. بافر فسفات ۶۷ میلی‌مولار (pH=۶/۸)، برای شستشو و شناور ساختن سلولها مورد استفاده قرارگرفت.

۲-۳ پرتودهی با فرابنفش (UV)

۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی در یک پتری دیش با قطر ۵ سانتی‌متر در فاصلهٔ ۴۰ سانتی‌متری از یک لامپ فرابنفش ۳۰ وات (HULI T8, Germany) که دارای شدتی[۵] برابر با ۰/۴ ژول بر مترمربع در ثانیه بود، پرتودهی شدند. در تمام مدّت پرتودهی، سوسپانسیون سلولی با یک همزن مغناطیسی همزده می‌شد. مراحل بعد، در نور زرد (لامپ بخار سدیوم) انجام گرفت تا احتمال ترمیم با انرژی نورانی[۶] وجود نداشته باشد. شمارش کلنی‌ها بر روی پلیت‌های محتوی محیط کشت جامد (آگار) پس از نگهداشتن آن در دمای ۳۷°C به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز (برای هالوفراکس رادیوتولرانس) و به مدت یک شب (برای اشرشیاکلی B/r) انجام گرفت. برای تهیه محیط کشت آگار، ۱/۵٪ آگار به هر محیط اضافه شد.

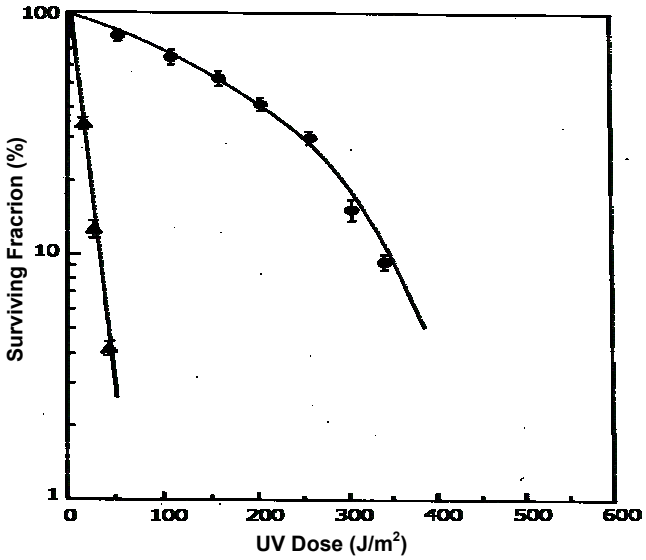
۲-۴ پرتودهی با گامای کبالت ۶۰

به سوسپانسیون سلولی (۳ میلی‌لیتر) در یک لوله شیشه‌ای ۵ میلی‌لیتری، با پرتوی گامای کبالت ۶۰، در نرخ دوز[۷] ۳۹ گری در دقیقه، پرتو داده شد. پرتودهی در دمای o°C صورت گرفت تا از تقسیم سلول‌ها در مدّت پرتودهی جلوگیری شود. برای پرتودهی نمونه‌ها از کبالت ۶۰ (Gamma Cell 220) استفاده شد. شمارش کلنی‌ها بر روی پلیت‌های آگار با همان روش پرتودهی با فرابنفش صورت گرفت.

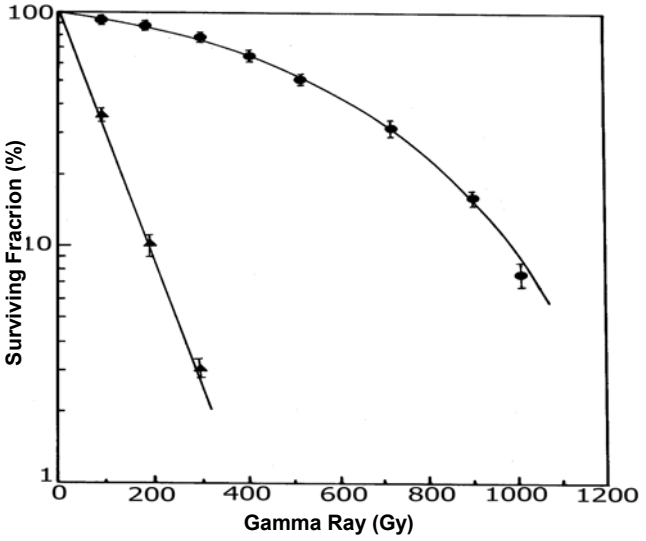
۳- بحث و نتیجه‌گیری

شکل ۱ نمودارهای بقای هالوفراکس رادیوتولرانس و اشرشیاکلی B/r را پس از پرتودهی با نور فرابنفش نشان می‌دهد. ارزش‌های $D_{۳۷}$ آنها به ترتیب برابر با ۲۳۱J/m^۲ و ۹J/m^۲ می‌باشد. بطوری که مشاهده می‌شود، هالوفراکس رادیوتولرانس در مقابل اثرهای کشندهٔ پرتو فرابنفش بسیار مقاوم‌تر از سویهٔ مقاوم اشرشیاکلی است.

شکل ۲ نمودارهای بقای این دو باکتری را پس از پرتودهی با گامای کبالت ۶۰ نشان می‌دهد. ارزش‌های $D_{۳۷}$ آنها به ترتیب برابر با ۶۴۵Gy و ۹۹Gy می‌باشد. در این مورد نیز، هالوفراکس رادیوتولرانس مقاومتی بیشتر از اشرشیاکلی B/r از خود نشان می‌دهد.



شکل ۱- نمودارهای بقای هالوفراکس رادیوتولرانس (●) و اشرشیاکلی (▲) پس از پرتودهی با نور فرابنفش. کسر بقا (surviving fraction) و انحراف معیارها (SD) که با سه بار آزمایش بدست آمده‌اند.



شکل ۲- نمودارهای بقای هالوفراکس رادیوتولرانس (●) و اشرشیاکلی (▲) پس از پرتودهی با گامای کبالت ۶۰. کسر بقا (surviving fraction) و انحراف معیارها (SD) که با سه بار آزمایش بدست آمده‌اند.

نتایج بدست آمده از مطالعهٔ اثر عوامل آسیب‌رسان به DNA، به طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است. از این نتایج معلوم می‌شود که مقاومت هالوفراکس رادیوتولرانس در برابر اثرهای کشندهٔ پرتو فرابنفش، ۲۵ مرتبه بیش از اشرشیاکلی B/r است. تاکنون سیستم ترمیم با کمک انرژی نور مرئی و ترمیم با برش و برداشت در تاریکی[۸] به خوبی در هالوباکتری‌ها شناخته شده است [۱۰ تا ۱۳]. برای جلوگیری از تأثیر نور مرئی، این آزمایش

جدول ۱- ارزشهای $D^{۳۷}$ و مقاومت نسبی هالوفراکس رادیوتولرانس (Hfx) و اشرشیاکلی B/r (E) در برابر پرتودهی نور فرابنفش وگامای کبالت ۶۰.

عامل کشنده	$D_{۳۷}^{*}$		مقاومت نسبی
	Hfx	E	Hfx/E
پرتو فرابنفش (UV) $J/m^{۲}$	۲۳۱	۹	۲۵/۷
پرتو گاما (Gy)	۶۴۵	۹۹	۶/۵

$^{*}D_{۳۷}$: دوز مورد نیاز برای کاهش توانایی زنده ماندن تا ۳۷٪ سلول های اولیه.

در نور زرد انجام گرفت. بنابراین، نتایج حاضر متضمّن چند احتمال است، از جمله: باکتریوروبرین موجود در سلول‌های هالوفراکس رادیوتولرانس، گونه‌های اکسیژن فعّال را به طور مؤثّر جاروب کرده، یا به عنوان جاذب انرژی UV عمل می‌کند. پیش از این، گزارش شده بود که پیگمان‌های کاروتنوئیدی با به کارگیری غیرمستقیم انرژی برای آنزیم ترمیم نوری که در بازگرداندن دایمرهای تیمین به طور طبیعی عمل می‌کنند، به ترمیم آسیب ناشی از پرتودهی کمک می‌نمایند [۱۰، ۱۴ و ۱۵]. از سوی دیگر، این امکان نیز وجود دارد که آنزیم‌های ویژه برای ترمیم دایمرهای تیمین که در اثر پرتوهای فرابنفش تولید می‌شوند، در سلول هالوفراکس رادیوتولرانس موجود باشند. در این صورت، حضور و سازوکار این آنزیم‌ها، باید در تحقیقات جداگانه‌ای مورد بررسی قرار گیرد.

مقاومت هالوفراکس رادیوتولرانس در برابر اثرهای کشندهٔ پرتو گاما تقریباً ۷ برابر اشرشیاکلی B/r است. علت مقاومت بیشتر هالوفراکس رادیوتولرانس را می‌توان چنین توجیه کرد که غلظت کلرید سدیوم در محیط کشت هالوفراکس بسیار بالاست، البته مقاومت زیاد آن فقط به دلیل غلظت این نمک نیست [۱۶]. از طرف دیگر غلظت کاتیون پتاسیوم (K^{+}) درون سلولی اکستریم هالوفیل‌ها از جمله هالوفراکس رادیوتولرانس به مراتب بیشتر از غلظت برون سلولی آن است [۱۷]. مطالعات قبلی ما نشان داده است که K^{+} با غلظت بالا، اثر محافظتی بر روی DNA در مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو مانند آسیب‌های ناشی از پرتودهی یون‌ساز، اعمال می‌نماید [۱۸ و ۱۹]. اما اثر محافظتی کاتیون K^{+} نیز به تنهایی پاسخگوی مقاومت بالای این ارگانیسم نمی‌باشد. پیش از این Saito و همکارانش، نشان داده‌اند که یک باکتری فوق‌العاده مقاوم در برابر پرتودهی به نام روبروباکتر رادیوتولرانس، دارای باکتریوروبرین به عنوان پیگمان اصلی خود می‌باشد، این رنگدانه دارای تعداد زیادی پیوندهای دوگانهٔ متّصل به هم[۹] است و یک جاروب‌کنندهٔ بسیار مؤثر برای رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل به شمار می‌رود. در واقع، باکتریوروبرین (که دارای ۱۳ پیوند دوگانهٔ متصل است) رادیکال‌های آزاد را بسیار مؤثرتر از بتا-کاروتن (که دارای ۱۱ پیوند دوگانهٔ متصل است) جاروب می‌کند [۴ و ۲۰]. این پیگمان در هالوباکتری‌ها [۵] و در هالوفراکس [۶] نیز یافت می‌شود.

از طرف دیگر، معلوم شده است که موتانت‌های فاقد رنگدانه نسبت به نوع وحشی در بعضی از باکتری‌های مقاوم، حساسیت بیشتری در مقابل پرتودهی از خود نشان می‌دهند [۱۸ و ۲۱]. بنابراین، ممکن است مقاومت بالای هالوفراکس در برابر پرتو گاما تا حدودی مربوط به وجود باکتریوروبرین باشد.

رادیکال‌های آزاد که بوسیلهٔ پرتوهای یونساز تولید می‌شوند، قادر به اکسید کردن اجزای سلولی مانند پروتئین‌ها و DNA هستند. واکنش بین باکتریوروبرین و رادیکال‌های آزاد ظاهراً اثر اکسیدکنندگی این عامل را کاهش می‌دهد. به عبارت دیگر این امکان وجود دارد که پیوندهای دوگانهٔ متصل فراوان باکتریوروبرین به عنوان محافظ، در برابر اکسیداسیون مؤثرتر عمل کند. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که باکتریوروبرین نقش مهّمی در مقاومت این باکتری در برابر عوامل اکسیدکنندهٔ آسیب‌رسان به DNA مانند پرتوهای یونساز ایفا می‌کند. مطالعات قبلی ما نیز نشان داد باکتریوروبرین به صورت مؤثّری در محافظت از DNA در برابر عوامل آسیب‌رسان، مانند پرتودهی یونساز عمل می‌نماید [۱۸ و ۱۹]. توضیح ممکن دیگر دربارهٔ تفاوت مقاومت در این دو ارگانیسم این است که مکانیسم‌های ترمیمی برای جبران آسیب‌های وارده بر DNA که آنزیم‌های گوناگونی را در اختیار دارند، ظرفیت‌های مختلفی را برای مقابله با این عامل اکسیداتیو یعنی پرتوهای یون‌ساز گاما در هالوفراکس رادیوتولرانس (یک آرکی باکتری مقاوم) و اشرشیاکلی B/r (یک یوباکتری مقاوم) ایجاد می‌کنند. در هر صورت برای درک دقیق مکانیسم‌های مقاومت نیاز به جداسازی موتانت‌های فاقد پیگمان باکتریوروبرین و نیز شناسایی آنزیم‌های ترمیمی و بررسی ویژگی‌ها و کارکرد آنها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارکنان محترم بخش پرتودهی گامای سازمان انرژی اتمی ایران که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه‌ای را مبذول داشته‌اند، اعلام می‌داریم. همچنین از آقای امین شاه‌محمدی، که در تایپ این مقاله دقّت و کوشش زیاد به عمل آورده‌اند، سپاسگزاریم.

پی‌نوشت‌ها:

۱- Extreme Halophile
۲- Archaea
۳- Survival Curves
۴- D_{37} Value
۵- Intensity
۶- Photoreactivation Repair
۷- Dose Rate
۸- Dark Excision Repair
۹- Conjugated Double Bonds

References:

1. C.R. Woese, O. Kandler, M.L. Whellis, "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya," proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 4576-4579 (1990).

2. C. Schiraldi, M. Giuliano, M. DeRosa, "Perspectives on biotechnological applications of archaea," Archaea **1**, 75-86 (2002).

3. E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, "DNA Repair and Mutagenesis," American Society of Microbiology. Washington D.C. (1995).

4. H.R. Shahmohammadi, E. Asgarani, H. Terato, H. Ide, O. Yamamoto, "Effects of ^{60}Co gamma-rays, ultraviolet light, and mitomycin C on Halobacterium salinarium and Thiobacillus intermedius," J. Radiat. Res., **38**, 37-43 (1997).

5. M. Kelly, S. Norgard, S. Liaaen-Jensen, "Bacterial carotenoids. 31. C_{50}- carotenoids. Carotenoids of Halobacterium salinarium, especially bacterioruberin," Acta Chem. Scand., **24**, 2169-2182 (1970).

6. C.D. Litchfield, A. Irby, T. Kis-Papo, A. Oren, "Comparisons of the polar lipid and pigment profiles of two solar salterns located in New York, California, Eliat, Israel," J. Industrial Microbiology and Biotechnology., **28**, 56-63 (2002).

7. J. Jagger, "Photochemistry and photobiology of nuleic acids," Academic Press. New York (1976).

8. E.M. Witkins, "Inherited difference in sensitivity to radiation in Escherichia coli," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **32**, 59-68 (1946).

9. S. Sehgal and N.E. Gibbons, "Effect of some metal ions on the growth of Halobacterium cutirubrum," Can.J. Microbiol., **6**, 165-169 (1960).

10. M.A. Hescox and D.M. Calberg, "Photoreactivation in Halobacterium cutirubrum," Can. J. Microbiol., **18**, 981-985 (1972).

11. S.J. McCready and L. Marcello, "Repair of UV damage in Halobacterium salinarum," Bioch. So. Trans., **31** (3), 694-698 (2003).

12. C.A. Praul and W.D. Taylor, "Responses of Halobacterium halobium and Sulfolobus solfataricus to hydrogen peroxide and N-methyl-N- nitrosoguanidine exposure," Microbiol. Res., **152**, 257-260 (1997).

13. P.S. Fitt and N. Sharma, "The fate of thymine-containing dimers in ultraviolet-irradiated Halobacterium cutirubrum," Biochem. Biophys. Acta., **910**, 103-110 (1987).

14. N.I. Krinsky, "The biological properties of carotenoids," pure App. Chem., **63**, 141-146 (1994).

15. C.E. Singer and N.B. Ames, "Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios," Science **171**, 822-826 (1970).

16. S. Zheng, G.L. Newton, J.F. Ward, R.C. Fahey, "Aerobic radioprotection of pBR322 by thiols: Effect of thiol net charge upon scavenging of hydroxyl radicals and repair of DNA radicals," Radiat. Res., **130**, 183-193 (1992).

17. A.T. Matheson, G.D. Sprott, I.J. McDonald, H. Tessier, "Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics, internal salt concentration, and morphology," Can. J. Microbiol., **22**, 780-786 (1976).

18. H.R. Shahmohammadi, E. Asgarani, H. Terato, T. Saito, Y. Ohyama, K. Gekko, O. Yamamoto, H. Ide, "Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of Halobacterium salinarium against DNA-damaging agents," J. Radiat. Res., **39**, 251-262 (1998).

19. E. Asgarani, H. Funamizu, T. Saito, H. Terato, Y. Ohyama, O. Yamamoto, H. Ide, "Mechanisms of DNA protection in Halobacterium salinarium, an extremely halophilic bacterium," Microbio. Res., **154**, 185-190 (1999).

20. T. Saito, y. Miyabe, H. Ide, O. Yamamoto, "Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin," Radiat. Phys., Chem. **50**, 267-269 (1997).

21. P. Alexander, C.J. Dean, C.D. Hamilton, J.T. Lett, G. Parkins, "In: Cellular Radiation in Biology," 241-263, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland (1965).