

خلاصه ارگانیزمهای نمکدوست: بررسی خواص جذب اسپکتروسکوپی و امواج میکروویو توسط آن

مهدی حسن شاهیان: دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

چکیده

باکتری‌های نمکدوست قادر به رشد در محیط فاقد نمک نیستند و دارای رشد بهینه در محیط‌هایی با میزان شوری نسبتاً زیاد هستند. آرکائی فوق العاده نمکدوست، شیمیوارگانوتروف هستند و بیشتر گونه‌ها هوایی اجباری هستند. باکتریورودوپسین یک پیگمان انتقال‌دهنده انرژی با استفاده از نور در غشاء ارگانی است، که تنها در نمکدوست‌ها یافت می‌شود. باکتری *Halobacterium salinarum*^۱ که در تحقیق قبلی از دریاچه نمک قم جadasازی شده بود، برای جadasازی و خالص‌سازی غشاء ارگانی بهکار رفت. غشاء ارگانی (PM) باکتری *Halobacterium salinarum* با استفاده از روش کثت باکتری و سپس دیالیز و سانتریفیوژ با دور بالا جadasازی شد. مطالعات جذب نوری در ۵۶۰ nm و بررسی نسبت جذب ۲۸۰/۵۶۰ nm برای اثبات خلوص غشاء ارگانی استفاده شد. فعالیت تغییر pH غشاء ارگانی با محلول نمکی حاوی $MgCl_2$ و KCl سنجیده شد. بهمکم دستگاه اشعدهی امواج میکروویو میزان جذب امواج میکروویو توسط غشاء ارگانی انداز مگیری شد. نتایج حاصل از جadasازی غشاء ارگانی نشان داد که نسبت جذب ۲۸۰/۵۶۰ در این طیف برابر $2/3$ بود که دلالت بر خلوص غشاء ارگانی جadasازی شده دارد. میزان ۲۵ میلی‌گرم غشاء ارگانی از ۴ لیتر محیط کثت حاصل گردید. غشاء خالص شده فعال بود بهطوری‌که به ازای هر ۶ ساعت مقدار ۱/۰ واحد کاهش pH در سوپراسیون دیده می‌شد. این غشاء ارگانی میزان ۶۰ درصد از امواج میکروویو را جذب می‌کرد. در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تنوع گسترهای در آرکائی فوق العاده نمکدوست در اکوسیستم‌های ایران وجود دارد و می‌توان از باکتریورودوپسین حاصل در اهداف نانوتکنولوژی استفاده کرد.

مقدمه

میکروارگانیسم‌هایی که قادر به زندگی در شرایط سخت نظیر دمای زیاد و کم، pH فلایابی و اسیدی، فشار هیدروستاتیک بالا و غلظت بالای نمک هستند را اصطلاحاً اکسترموفیل^۲ می‌نامند. نمکدوست‌ها^۳ گروهی از اکسترموفیل‌ها هستند که قادر به رشد در محیط واحد نمک سدیم کلراید هستند و برای زندگی در محیط‌های سور تطبیق یافته‌اند [۶]. تاکنون پژوهش‌های روی آرکائی نمکدوست انجام شده است. این میکروارگانیسم‌ها

واژه‌های کلیدی: نمکدوست، غشاء ارگانی، دیالیز، امواج میکروویو و باکتریورودوپسین

دریافت ۸۹/۱۲/۹ پذیرش ۹۰/۱۰/۱۱

hasanshahi@gmail.com

نویسنده مسئول

۱. *Halobacterium salinarum*

۲. Extremophile

۳. Halophiles

دارای باکتریورودوپسین^۱، هالورودوپسین^۲، واکوئل‌های گازی، پروتئین‌های اختصاصی و تطابق بینظیر با غلظت بالای نمک هستند. در مقایسه با آرکنای نمکدوست، باکتری‌های حقیقی نمکدوست و تحمل کننده نمک، علی‌رغم گستردگی وسیع جغرافیایی و پتانسیل بالا در کاربردهای بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی، کمتر بررسی شده‌اند [۲، ۷].

یک نمکدوست ارگانیسمی است که حداقل به $1/5$ مولار NaCl برای رشد نیاز دارد. اکثر گونه‌ها به $2-4$ مولار NaCl برای رشد بینه نیاز دارند. در واقع همه نمکدوست‌های فوق العاده می‌توانند در $5/5$ مولار نمک رشد کنند. هالوباکتریم سالیناروم ارگانیسمی مدل، برای شاخه آرکنای نمکدوست است. این باکتری باسیلی متحرک است و می‌تواند در محیط‌های فوق العاده شور زندگی کند و از گونه‌های نادری است که قادر به رشد در نمک اشباع است [۱].

هالوباکتریم سالیناروم از نور به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند این به دلیل فعالیت پروتئین رتینال یا همان باکتریورودوپسین به عنوان پمپ هدایت‌کننده پروتون است [۸، ۹]. پمپ پروتونی مشتق از نور باکتریورودوپسین پروتون را از عرض غشای سلولی هدایت می‌کند و ATP از طریق فوتوفسفریلاسیون تولید می‌شود که به عنوان منبع انرژی شیمیایی برای رشد سلول استفاده می‌شود. باکتریورودوپسین، در صفحات شش وجهی بنام غشای ارگوانی سازمان‌دهی می‌شود. که قسمتی از غشای سلولی هستند [۱۲، ۱۵].

باکتریورودوپسین کاربردهای بیوتکنولوژیکی متعددی دارد که از بین آن‌ها می‌توان ایجاد سلول‌های خورشیدی با استفاده از تلقیح باکتریورودوپسین به داخل دو لایه لبیدی، شوریزی‌دادی با بهکار گرفتن آنتی پورت H/Na، سنتز ATP و طراحی نانو حفره‌ها در نانوتکنولوژی را نام برد [۱۳].

هدف از این تحقیق بررسی خواص فیزیکو‌شیمیایی غشای ارگوانی جداسازی، و خالص شده از باکتری هالوباکتریم سالیناروم بومی است که از دریاچه نمک قم جداسازی شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری هالوباکتریم سالیناروم

برای جداسازی این باکتری، از مناطق شور ایران شامل دریاچه نمک در استان قم و دریاچه نمک مهارلو در استان فارس نمونه‌برداری شد. روش‌های بهکار رفته برای جداسازی و شناسایی این باکتری بهطور کامل و دقیق در مقاله‌ای که قبلاً به چاپ رسیده است، شرح داد شده است [۱۰].

جداسازی غشای ارگوانی هالوباکتریم سالیناروم

روش استفاده شده برای جداسازی غشای ارگوانی^۳ (PM) باکتری هالوباکتریم سالیناروم روش یاسل^۴ و همکاران

۱. Bacteriorhodopsin

۲. Halorhodopsin

۳. Purple Membrane

۴. Yucel

(۱۹۹۵) است که مراحل این روش بدین صورت است:

ابتدا برای تهیه پیش کشت کانی‌های باکتری از محیط^۱ HM با ترکیب زیر در یک لیتر آب مقطر ساخته شد:

۵ گرم گاز‌آمینواسید، عصاره مخمر ۵ گرم، تری‌سدیم سیترات ۳ گرم، ۲۰ MgSO₄ ۲ گرم، ۲۵۰ NaCl ۲۵ گرم، ۲۶ FeCl₂.4H₂O ۲۶ میلی‌گرم، سپس کانی‌های خالص از کشت باکتری بداخل ارلن‌ها تلقیح گردید. ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۰۰ rpm و همزمان با نوردهی به مدت ۳ روز قرار گرفتند [۹]. محتوای ارلن‌های پیش کشت سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در پایه نمکی HM محلول وارد شد. بهطور همزمان چهار ارلن ۲۰۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد و در هر یک مقدار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط HM اضافه شد. ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۰۰ rpm و تحت نوردهی (۱۰۰ وات) قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۰ روز محتوای ۴ ارلن ۲۰۰۰ میلی‌لیتری با دور ۴۰۰۰ rpm ۴۵ دقیقه در دمای ۴۰°C سانتریفوژ شدند. به سوسپانسیون باکتریایی حاصل (۱۰۰۰ ml) از این مرحله مقدار ۱۰۰۰ µl از DNase با واحد U ۱۰۰۰ اضافه شد و سپس با ۱/۰ مولار دیالیز شد. عمل دیالیز به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴۰°C انجام شد. پس از اتمام مرحله دیالیز محتویات آن درون لوله سانتریفوژ ریخته شد و سانتریفوژ در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰°C انجام شد. رسوب حاصل از سانتریفوژ دور ریخته شد و سوپرناتانت حاصل از این مرحله درون لوله‌های سانتریفوژ ریخته شد و در دور ۱۹۰۰۰ rpm ۹۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس رسوب ارگانی حاصل جمع‌آوری شد و سوپرناتانت دور ریخته شد. رسوب حاصل در ۱/۰ مولار حل گردید و سانتریفوژ دوم در دور ۱۹۰۰۰ rpm به مدت ۹۰ دقیقه تکرار شد. پس از این مرحله رسوب حاصل که اصولاً باید حاوی باکتریورودوپسین باشد در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و تا زمان استفاده در ۲۰°C نگهداری شد [۱۱].

بررسی‌های جذب اسپکتروسکوپی باکتریورودوپسین و اثبات خلوص

غشای ارگانی (PM) در ۵۶۰ nm دارای ماکریم جذب است. باکتریوروبرین قرمز که مهمترین آلودگی PM محسوب می‌شود دارای جذب در نواحی ۴۷۰ nm و ۴۹۸ nm است. حضور پیک‌های ناخواسته در ۵۶۰ nm دلالت بر وجود باکتریوروبرین قرمز رنگ همراه با باکتریورودوپسین است. مورد دیگری که در بررسی‌های جذب نوری باید به آن توجه کرد نسبت جذب ۲۸۰/۵۶۰ nm است که هر چه این نسبت کمتر باشد خلوص باکتریورودوپسین بیشتر و آلودگی با سایر پروتئین‌ها کمتر است [۳، ۴].

جذب نوری غشای ارگانی خالص شده در ۴۷۰ nm، ۴۹۸ nm، ۲۸۰ nm و ۵۶۰ nm بهمکم دستگاه اسپکتروسکوپی (نوع UV-Visible مدل Shimadzu) اندازه‌گیری شد.

۱. Halophil Medium

بررسی فعالیت غشای ارگوانی

برای اثبات فعالیت غشای ارگوانی (PM) فعالیت تغییر pH آن بررسی شد. از آنجایی که غشای ارگوانی یک پمپ پروتونی مشتق از نور است بنا بر این می‌تواند به‌کمک نور باعث انتقال پروتون به‌خارج از فضای سلول گردد و حضور یون‌های پروتون (H^+) در محلول موجب کاهش pH می‌گردد.

برای بررسی فعالیت ابتدا دو ارلن ۵ میلی‌لیتری با این محتوا تهیه شد:



pH اولیه هر دو ارلن با محلول‌های KOH و HCl در ۶/۸۵-۷/۲ تنظیم شد. با دور بسیار کم به گردش در آمدند طوری که فقط محلول حرکت کمی داشته باشد و ایجاد رسوب جلوگیری شود. دو چراغ مطالعه با لامپ ۲۰۰ وات و یک پنکه نیز در کنار لامپ‌ها در فاصله ۳۰ سانتی‌متری از ارلن‌ها نصب گردید. دمای آزمایش باید در 30°C ثابت بماند و وجود لامپ‌ها تولید گرما کند. pH اولیه هر دو ارلن در ابتدا ثبت گردید و سپس هر ۶ ساعت یک بار pH هر دو ارلن (شاهد و نمونه مورد آزمایش) به‌کمک دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد و این عمل تا ۴۸ ساعت ادامه یافت [۱۴، ۱۷].

اندازه گیری جذب امواج میکروویو توسط غشای ارگوانی

به‌کمک دستگاه اشعدهی امواج میکروویو میزان جذب این امواج توسط غشای ارگوانی اندازه‌گیری شد.

مشخصات محفظه نمونه استفاده شده (کلاوک) بدین صورت است:

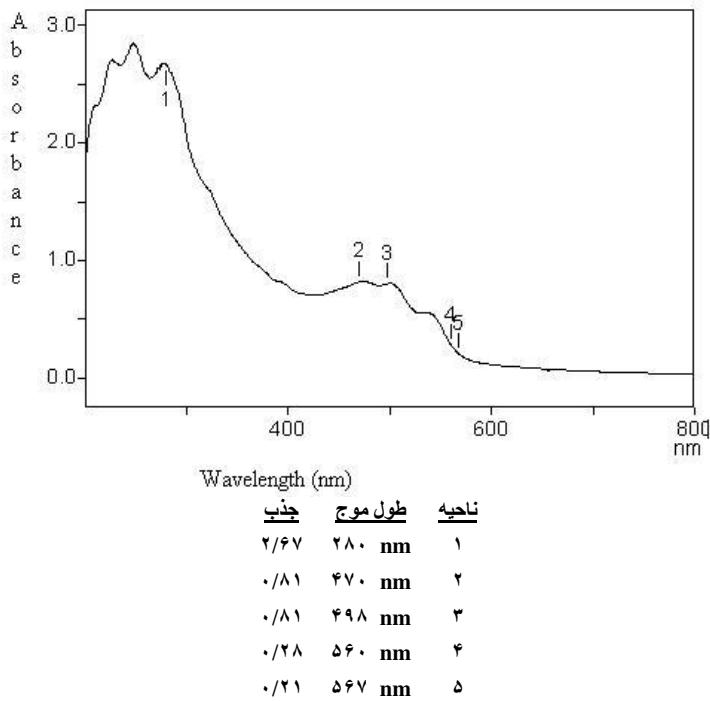
۲۲/۹ میلی‌متر طول، ۱۰ میلی‌متر عرض و ۳۱ میلی‌متر ارتفاع و گنجایش آن برابر ۸ میلی‌لیتر است. نمونه شاهد در آزمایش‌های جذب آب مقطر است و کالیبراسیون نیز با آن صورت پذیرفت. نحوه اشعدهی بدین صورت است که دامنه امواج بین ۸ تا ۱۲ گیکا هرتز به‌کار گرفته شد و مدت زمان اشعدهی برای هر نمونه ۱۵ دقیقه است [۱۹].

نتایج

جذب غشای به دست آمده قبل از انجام دیالیز

پس از این‌که باکتری‌ها از حجم ۴ لیتر محیط کشت رسوب یافته‌اند و در داخل محلول پایه نمکی سوسپانسیون شدند، جذب نوری آن‌ها قبل از انجام دیالیز اندازه‌گیری شد. شکل ۱ طیف جذبی این سوسپانسیون را نشان می‌دهد و در زیر شکل نواحی مشخص مقدار جذب آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان پروتئین کل سلولی (جذب در 280 nm) بالا است و نیز جذب غشاهای (باکتریورودوپسین و باکتریوروبین) پایین است که امری طبیعی است زیرا هنوز سلول‌ها لیز نشده‌اند و غشای آن‌ها دست نخورده است. از طرفی نسبت جذب $280/560$ که

به عنوان یک شاخص برای اثبات خلوص است. در نمونه‌های قبل از دیالیز برابر $9/5$ است که نشان‌دهنده درصد زیاد باکتریوروبرین نسبت به باکتریورودوپسین است.



شکل ۱. جذب غشا به دست آمده بعد از سانتریفوژ اول و قبل از انجام دیالیز

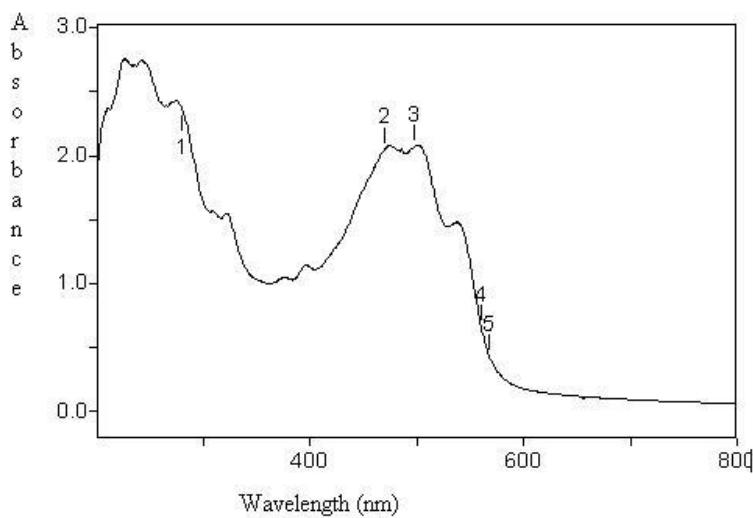
جذب غشای ارگانی خالص شده

رسوب حاصل از سانتریفوژ مرحله دوم نمونه اصلی غشای ارگانی بود که بررسی‌های بعدی روی آن صورت گرفت. شکل ۲ طیف جذبی نمونه اصلی را نشان می‌دهد که در آن مقدار جذب غشای ارگانی افزایش یافته است با وجود این که هنوز دارای شاخه‌های جانبی باکتریوروبرین قرمز رنگ است.

نسبت جذب $280/560$ در این طیف برابر $۳/۳$ است که اگر این عدد را با عدد به دست آمده از طیف جذب اولیه ($9/5$) مقایسه کیم نشان‌دهنده کاهش $۶/۲$ واحدی طیف جذبی است که دلیلی بر خلوص بالا و جدا شدن سایر پروتئین‌های سلولی و همچنین باکتریوروبرین قرمز از باکتریورودوپسین (PM) است، زیرا هر چه این عدد کمتر باشد خلوص باکتریورودوپسین بیشتر است.

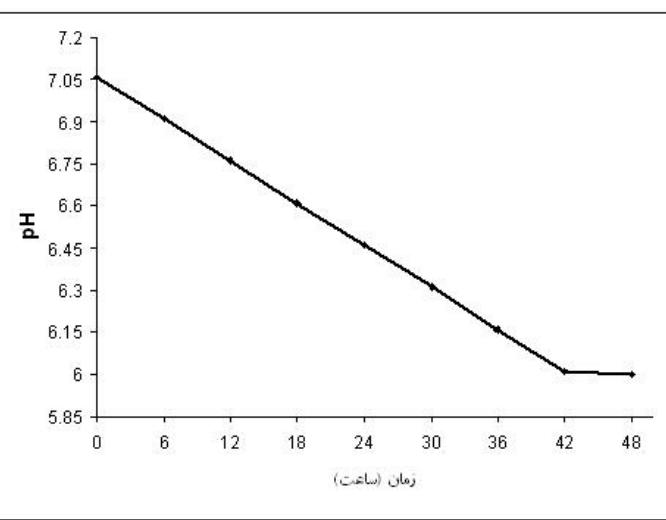
اثبات فعالیت PM استخراج شده با استفاده از تغییر pH

شکل ۳ فعالیت PM را با کاهش pH نشان می‌دهد. چنان‌که در شکل مشاهده می‌شود به‌ازای هر ۶ ساعت مقدار $۰/۱۵$ واحد کاهش pH در سوسپانسیون دیده می‌شود، به عبارت دیگر به‌ازای هر ساعت $۰/۰۲۵$ واحد در pH سوسپانسیون کاهش وجود دارد که دلیلی بر فعالیت باکتریورودوپسین استخراج شده دارد.



شکل ۲. طیف جذبی غشای ارگانی خالص شده

نامه	طول موج	جذب
۱	۴۷۰ nm	۲/۰۵
۲	۴۹۸ nm	۲/۰۶
۳	۵۶۰ nm	۰/۶۶
۴	۵۶۷ nm	۰/۴۳



شکل ۳. کاهش pH در اثر فعالیت غشای ارگانی خالص سازی شده

پس از گذشت ۴۸ ساعت سوسپانسیون PM که تحت نوردهی قرار داشت به تاریکی منتقل شد و ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفت. با توجه به این که در تاریکی واکنش برگشت پروتونها صورت می‌گیرد به طور طبیعی pH سوسپانسیون باید افزایش پیدا کند. پس از گذشت ۲۴ ساعت pH سوسپانسیون PM برابر $6\frac{1}{4}$ بود و با توجه

به این که pH سوسپانسیون قرار گرفته در روشنایی برابر ۶ است لذا pH پس از گذشت ۲۴ ساعت ۰/۴ واحد در این مدت افزایش داشته است که این دلیل دیگری بر اثبات فعالیت PM است.

نتایج حاصل از جذب امواج میکروویو توسط PM استخراج شده

نتایج آزمایش جذب امواج میکروویو توسط PM استخراج شده با استفاده از دستگاه اشعه‌دهی میکروویو در جدول ۱ نشان داده شده است.

جذب کاواک بدون آب که نسبت به آب و محلول کالیبره شده بود اندازه گیری شد. این جذب از این رو واجد اهمیت است که باید جذب نمونه از آن کسر شود و جذب واقعی نمونه بدست آید. با توجه به جدول کاواک بدون آب دارای 1dB 5dB جذب است.

غشای ارگوانی استخراج شده که در آب دوبار نقطیح حل گردیده بود وارد کاواک شد و جذب امواج میکروویو در دامنه بین ۸ تا ۱۲ گیگاهرتز با دستگاه سنجش جذب امواج میکروویو اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود غشای ارگوانی قادر به جذب امواج میکروویو بوده است. چنان‌چه میانگین جذب بدست آمده را از اختلاف جذب حاصل از کاواک بدون آب و شاهد (آب مقطر) کسر کنیم مقدار 6dB جذب واقعی غشای ارگوانی است و از آنجاکه هر 3dB برابر با 30 درصد جذب است بنا بر این PM حاصل در این تحقیق قادر است که 60 درصد از امواج میکروویو را جذب کند.

جدول ۱. جذب امواج میکروویو توسط غشای ارگوانی (PM) استخراج شده

نمونه مورد آزمایش	میزان جذب امواج میکروویو
شاهد کالیبره شده (آب مقطر)	2dB
کاواک خالی	5dB
غضای ارگوانی	12dB

بحث

روش‌های گوناگونی به وسیله محققان مختلف برای جداسازی و خالص‌سازی غشای ارگوانی به کار رفته است که هریک از این روش‌ها دارای مزايا و معایبي است. اویسترهلت^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۷ از روش اولتراسانتریفیژن در گرادیان غلظتی سوکروز برای جداسازی غشای ارگوانی استفاده کردند [۵]. نئومن^۳ و همکاران در سال ۱۹۹۲ از روش ژل فیلتراسیون برای جداسازی و خالص‌سازی غشای ارگوانی استفاده کردند. آن‌ها از ستون کروماتوگرافی حاوی سفاکریل 100-S برای جداسازی غشای ارگوانی از سایر قطعات همراه با آن استفاده کردند [۱۶].

۱. Deci Bel

۲. Oesterhelt

۳. Neumann

روش ژل فیلتراسیون در مراحل اولیه خود مشابه روش اویستر هلت است چنان که لیز سلولی با دیالیز صورت می‌گیرد اما پس از مرحله لیز سلولی نمونه حاصل با دور rpm ۳۸۰۰۰ ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و وارد ستون ژل فیلتراسیون می‌شود.

روش بهکار رفته برای جداسازی غشای ارگانی در این تحقیق با اندکی تفاوت بر اساس روش یاسل^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۵ بود [۱۱]. یوسل و همکاران برای لیز سلولی عمل دیالیز را به مدت ۳ روز در دمای 4°C انجام دادند ولی در این تحقیق دیالیز به مدت ۱۶ ساعت در 4°C گرفت. همچنین یوسل و همکاران برای رسوب نهایی غشای ارگانی از سانتریفوژ دور g ۳۲۰۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه و دو مرتبه استفاده کردند. ولی در تحقیق حاضر از دور g ۵۰۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه و دو مرتبه استفاده شد. روش بهکار رفته در این تحقیق دارای این مزیت بود که اولاً نیازمند تجهیزات پیچیده از قبیل اولتراسانتریفوژ و شبی غلطی سوکروز نبوده و ثانیاً میزان غشای ارگانی حاصل در مقایسه با روش‌های دیگر در حد قابل قبولی بود زیرا از دست رفتن آن در طی مراحل جداسازی به حداقل می‌رسید. در تحقیق حاضر PM حاصل دارای نسبت جذبی برابر $3/5$ بود که البته نسبت به نتایج به دست آمده توسط اویستر هلت که از روش اولتراسانتریفوژ استفاده کرد نسبت زیادی است $3/5$ در برابر $1/5$). خلوص PM حاصل از این تحقیق با نتایج یاسل و همکاران (۱۹۹۵) و نثمن و همکاران (۱۹۹۲) همخوانی دارد [۱۶، ۱۱].

کویاما^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۷ فعالیت باکتریورودوپسین حاصل از هالوباکتریم سالیناروم را بررسی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که حضور یون منیزیم در غلظت فیزیولوژیک تغییر pH القا شده با نور را افزایش می‌دهد بهطوری‌که بدون یون منیزیم تغییر pH تقریباً بین ثانیه‌های کمی پس از نوردهی اشباع می‌شود و ۵ پروتون به ازای هر مولکول باکتریورودوپسین بیشتر رها نمی‌گردد [۱۷].

در این تحقیق برای بررسی فعالیت PM به دست آمده از محلول توصیه شده توسط کویاما و همکاران استفاده گردید. این محلول حاوی $80\text{ میلیمول از MgCl}_2$ و 3 میلیمول از KCl است [۱۷]. PM به دست آمده دارای فعالیت کاهش pH بود بهطوری‌که به ازای هر $6\text{ ساعت} / ۱۵\text{ واحد کاهش pH}$ در محلول مشاهده گردید. این نتیجه با یافته‌های بریمن^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد با این تفاوت که آن‌ها کاهش $2/0\text{ واحدی}$ به ازای هر $6\text{ ساعت را مشاهده کردند}$ [۱۸].

نکته دیگری که در مورد فعالیت PM حاصل در این تحقیق، این است که بعد از آن که سوسپانسیون حاوی PM و محلول به تاریکی منتقل شد، pH پس از $24\text{ ساعت به میزان } 5/0\text{ واحد افزایش داشت}$ که با گزارش‌های به دست آمده توسط محققان دیگر از قبیل بریمن و همکاران (۲۰۰۳) و یاسل و همکاران (۱۹۹۵) همخوانی دارد [۱۸، ۱۱].

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که غشای ارگانی خالص‌سازی شده در این تحقیق واجد فعالیت زیستی به عنوان یک پمپ پروتونی است. این غشای ارگانی قابلیت جذب امواج میکروویو را دارد و از آن‌جاکه دارای باکتریورودوپسین است، می‌توان در طراحی نانوچرخه‌ها در نانوتکنولوژی آنرا بهکار برد.

قدرتانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه قدردانی می‌شود.

منابع

1. A. Oren, "Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria", FEMS Microbiology Ecology, 39 (2002) 1-7.
2. B. Ozcan, C. Cokmus, A. Coleri, M. Caliskan, "Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey", Microbiology, 75 (2006) 739-746.
3. B. Sternberg, C. A. Hostis , A. Watts, "The essential role of specific *Halobacterium halobium* polar lipids in 2D-array formation of bacteriorhodopsin", Biochemistry Biophysics Acta, 1108 (1992) 21-30.
4. C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, "Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives", Wiley-vch Verlag GmbH & Co.kgaa, Weinheim, Chapter 11 (2004) 146-166.
5. D. Oesterhelt, D. Stoeckenius, "Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane", Methods Enzymology, 31(1997) 667-78.
6. F. Sergiu, L. Andrea, P. Marion, G. Claudia, "Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival", Review Environmental Science Biotechnology, 5 (2006) 203-218.
7. J. K. Lanyi," Halorhodopsin: a light-driven chloride ion pump", Annual Review of Biophysics. 15 (2004) 11-28.
8. K. L. Janos, "Bacteriorhodopsin", Annual Review of Physiology, 66 (2004) 665-88.

9. M. Brian, S. Y. Becher, "Improved isolation procedures for the purple membrane of *Halobacterium halobium*", *Preparative Biochemistry*, 5 (2) (1975) 161-178.
10. M. Hassanshahian, J. Mohamadian, "Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline Lakes in Iran", *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4 (Supplement 1) (2011) S27-S33.
11. M. Yucel, M. Baker, T. Zabut, "Kinetic analysis of light induced proton dissociation and association of bacteriorhodopsin in purple membrane fragments under continuous illumination", *Journal of Membrane Science*, 104 (1995) 65-72.
12. N. A. Hampp, "Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53 (2000) 633-639.
13. R. Margesin, F. schinner, "Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology", *Extremophiles*, 5 (2001) 73-83.
14. R. Renthal, J. K. Lanyi, "Light-induced membrane potential and pH gradient in *Halobacterium halobium* envelope vesicles", *Biochemistry*, 15 (1976) 2136-2143.
15. S. Bickel-Sandkötter, W. Gärtner and M. Dane, "Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis", *Archive of Microbiology*, 166 (1996) 1-11.
16. S. Neumann, H. Leigeber, "Process for the preparation of purple membrane containing bacteriorhodopsin", United States Patent 5079149, (1992), 24-52.
17. T. Kouyama, A. Kouyama, A. Kegami, "Bacteriorhodopsin is a powerful light-driven proton pump", *Biophysics Journal*, 51(5) (1997) 839-841.
18. W. Braiman, "Infrared studies of bacteriorhodopsin", *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (2003) 868-871.
19. Z. Baker, M. Kamal, G. Ufuk, T. Lemi, "Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and *Halobacterium salinarum* in a Photobioreactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (2006) 553-1562.