

ترکیبات نگهداری لیپید در باکتری های دریایی

چکیده

چهل باکتری دریایی (آبزی) استفاده کننده از روغن خام سایکر و تروفیک یا سایکرو تروفیک یا سایکروتروفیل (به ترتیب Psychrophile , Psychrotrophic) (که اولی نوشته می شوند) برای توانشان جهت تراکم سازی ترکیبات نگهداری لیپیدشان در سیتوپلاسم در طی پرورشی تحت شرایط محدود کننده نیتروژن، مورد تحقیق و بررسی قرار گرفتند. بیشترشان (۷۳٪) قادر به تراکم سازی لیپیدهای عظیمی نظیر اسیدهای پلی هیدروکسی آلکانوئیک (PHA) بودند در حالیکه دیگر لیپیدها همانند استیرهای واکسن (موم) در دو ایزوله رخ می دادند. تراکم یا انباشتگی یا توده شدن PHA بطور غالب در دوره های پائین $^{\circ}\text{C}$ (۲۰-۴) طبق آنچه برای سه ایزوله نشان داده شد، رخ داد. میکروسکوپی الکترونی ضخائم پلی فسفات را که در دو ایزوله برای PHA رخ می دهد، آشکار کرد. سلولهای (۱) *Acineto bacter sp* (منبع بصورت "A" می آید) ایزوله، قادر به سنتز کردن و تراکم نمودن ضمائم لیپیدی در طی رشد بر استارت، اتانول، روغن زیتون، هگزامانول و هپتادکان بودند. ترکیب و کمپوزیسیون ضمائم لیپیدی بر ترکیبات فراهم شده

بعنوان منبع مرکزی، بستگی داشتند. (سیتراهای واکسن (موم = Wax) واکیل گلیسرول
ها اساساً در طی پرورش بر روغن زیتون رخ می دادند و در مقابل استرهای واکسن یا
مومی و الکل های آزاد در طی پرورش بر هگزاد کانول رخ می دادند. کل اسیدهای
چرب در سلولهای A بالغ بر میزانی تا ۲۵٪ از وزن خشک سلولی در سلولهای رشد
یافته بر روغن زیتون می شدند. اسید پالمیتیک (Palmitic acid) اسید چرب اصلی در
لیپیدها در طی پرورش بر هگزاکانون، هپتا دکان یا روغن زیتون رخ می دادند به منبع
کربن مرتبط بودند. (اسیدهای چرب حاضر در لیپیدهای تراکم، بگونه ای غالب و محاط
از اسیدهای چرب باز غده مستقیم اشباع شده و اشباع نشده با طول زنجیره متغیر از ۱۲
تا ۱۸ اتم کربن، تشکیل می شدند. تحلیل و آنالیز پروتئین های توأم با لیپید دانه در
سلولهای A پروتئین

۳۹ Kda را بعنوان گونه پروتئینی غالب آشکار و واضح ساختند.

مقدمه:

شرایط محیطی (محیط زیست) که در ساحل خلیج (در آرژانتین) San Jorge رخ میدهند، با دمای آب دریا تقریباً 5°C و 15°C (به ترتیب) در فصول زمستان و تابستان و با درجه بالای آلودگی بواسطه نفت خام در برخی محلها با این اکوسیستم را برای ایزولاسیون میکروارگانیسم های و سایکروتروفیک و سایکروفیک (کننده در هیدروکربنی مطلوب می سازد. چنین ارگانیسم های منطبق شده با سرمای قادر به بقا و قادر به رشد در محیط های سرد بوده که در بیشتر اکوسیستم های دریایی بوقوع می پیوندند. اینکه جمعیت میکربی محیط های دریایی اغلب در معرض دیگر شرائط همانند موجودیت مواد مغذی قرار می گیرند. میکروارگانیسم ها انواع استراتژی هایی که اجازه بقایشان در این محیط های متغیر را می دهند توسعه می دهند که تراکم نگهداری لیپیدها یکی از آنها است. ترکیبات نگهداری بطور نرمان بصورت ضمائم فوق سلولی در باکتری ها رخ می دهند.

تراکم ضمائم لیپیدی توسط یک ایزوله در طی رشد بر انواع طبقات فرعی می پردازیم

مواد و روش ها: منبع میکروارگانیسم ها، محیط ها و روش غنی سازی

رشته های بکار رفته در این مطالعه از نمونه های آب دریایی سطحی که از روغن خام استفاده می کند (بعنوان تنها منبع کربنی) غنی شده و ایزوله شده است. نمونه ها از ساحل خلیج San Jorge در آرژانتین در طی دسامبر ۱۹۹ و ۱۹۹۳ جمع آوری شدند.

دماهای نمونه ها بین 5°C و 15°C متغیر بودند یک کلکتور یا گیرنده فلزی گرفته شده و در تمام اوقات در یخ حمل و نقل می شدند. تقریباً ۵ml آب دریا توسط کلتراسیون از طریق یک فیلتر استریل غشایی با اندازه روزانه $0.45\ \mu\text{m}$ ، متراکم و کنسانتره شد. کنسانتره به سالین فیزیولوژیکی استریل ۵۰ml اضافه شد و هم زده شد.

محیط معدنی (MSM) بنا به Schlege et al با ۵ml از این سو از این سوسپانسیون آغشته شد (تلقیح شد). پس از ۷-۵ روز از زمان تلقیح یا آغشته شدن در 7°C این کشت جهت آغستگی یا تلقیح پلیت های Msu/agar بکار رفت که حاوی روغن خام بعنوان منبع کربن بود و پلیت ها در 7°C و 20°C آغشته شد. (از برای خلوص رشته های در حال رشد استفاده شد).

مورفولوژی، آزمایشی بیوشیمیایی و رشد باکتری ها:

ایزوله ها جهت کسب شناخت و هویت رده بندی مقدماتی تحلیل و آنالیز شدند. آزمایشات و رده بندی ها بصورت زیر است: شکل سلول، شکل کلنی و رنگ Gramstian، Catalase، اکسیداز، تست of اصلاح شده Liefsen و آزمایش API20E ایزوله ۲۱۱ در DSMZ وارد شد که هویتش بعنوان یک گونه از را تأیید کرد و شماره کلکسیون ۱۱۰۴۲ DSMZ را بدست آورد. سلولها بصورت هوازی در 4°C یا 20°C در محیط (گوشت) غذایی یا محیط نمکهای معدنی رشد یافتند که با ۲٪ کلراید سدیم و منبع کربن مربوطه تکمیل شد. جهت مجاز داشتن تراکم لیپیدها، غلظت و تراکم کلراید آمونیوم در محیط معدنی تا ۰/۰۵٪ کاهش یافت. جهت کسب محیط جامد شده ۱/۸٪ agar اضافه شد. برای بررسی میکروسکوپی ضنائم لیپیدی سلولها با B سیاه Sudan با بکارگیری سفرانین بنا به Burdon مورد مطالعه قرار گرفتند. کل فسفات توسط آزمایش اسپکترومتری طبق شرح Watanabe folsen تحلیل و آنالیز شد.

عصاره گیری (استخراج) لیپید و کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

جهت تعیین کردن هویت لیپیدها TLC با نمونه های کل سلولهای استخراج شده با ترکیبی از متانول - کلرو فرم اجرا شد. کروماتوگرافی بر پلیت های ژل سیلیس ۶۰ اجرا شد که سیستم های حلال زیر را بکار گرفتند. اسید استیک / اتر دی اتیل / هگزان .

کسرهای لپیدی توسط بخار ید قابل رویت بودند. عناصر مرجع زیر بکار گرفته شدند.

اسید پالمیتیک ، اسید استریک دی پالمیتین تری پالمیتین ، گلیسرول rac میوسیتویل -

دی پالمیتویل - آوا - ستیل پالمیت و

۱- هگزاد کانول

تحلیل و آنالیز اسیدهای چرب و PHA

جهت تعیین محتوای PHA یا اسید چرب سلولها و ترکیب مواد نگهداری اسیدهای

چرب یا پلی استرها به اسید چرب تشکیل دهنده تغییر شکل یافتند. این اسیدها توسط

کروماتوگرافی گازی با یک کروماتوگراف گازی مجهز به ستون ۲۵MX Permaphase

PEG و یک ردیاب یونیزاسیون شعله مورد تحلیل قرار گرفتند. نسبت ۲ μ l فاز ارگانیک

پس از تقسیم تزریق تحلیل شد. هلیوم بعنوان گاز حامل بکار رفت . دماهای انژکتور و

ردیاب $^{\circ}C$ ۲۳۰ و $^{\circ}C$ ۲۷۵ بودند. یک برنامه دمایی برای جدایی کارآمد استرهای متیل

بکار رفت. به انضمام ردیابی استرهای متیل اسیدهای هیدروکسی آلکانوئیک این روش

هم چنین اجازه ردیابی اسیدهای آلکانوئیک - n با ۷-۱۸ اتم کربن را می داد. اسیدهای

چرب توسط قیاس مقادیر R_F اسیدهای چرب استاندارد مربوطه شناخته شدند. برای

تحلیل کمی اسید یا اسید تری دکانوئیک و اسید تترادسنوئیک بعنوان استانداردهای

داخلی بکار رفتند.

ایزولاسیون انضمام لیپیدی:

انضمام یا ضمائم لیپیدی توسط سانتری فوژ کردن در گرادیانهای چگالی بنا باد
Preastiny etal ایزوله شدند. سلولها در MSM با روغن زیتون بعنوان تنها کربن تحت
شرائط محدودگر نیتروژن بمدت ۷۲-۹۶ ساعت در محیط ۵۰۰-۱۰۰۰ ml پرورش یافته
و سپس توسط سانتری فوژ کردن برداشت شده و در TRIS/HCL مجدداً معلق شدند.
پس از عبور سه گانه از یک فرانسوی (Prench)، عصاره های بدون سلول بدست
آمدند و ۲-۳ ml برا بالای یک گرادیان ساکاز و زلود شد. گرادیانهای ساکاروز مقطع از
هر ۲ ml از ۰/۳ و ۰/۶ و ۱/۲ و ۲ M ساکاروز در TRIS/HCL مهیا شدند. گرادیان در
۴ °C بمدت ۵ ساعت در ۱۷۰۰۰۰ g سانتری فوژ شد. دانه ها یا گرده ها از گرادیانها
جمع آوری شده و متعاقباً توسط ۲۰ دقیقه سانتری فوژ کردن شسته شدند. ضمائم متعاقباً
در معرض تحلیل شیمیایی و سولفات سدیم قرار گرفتند.

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید و تعیین کردن اسید آمینه ترمینال

ضمائم ایزوله شده در بافر لور کننده ژل معلق شدند که حاوی ۰/۶٪ از SDS، ۱/۲۵
٪ از ۲- مرکاپتواتانول و ۰/۲۵ mm Edta و ۱۰٪ گلیسرول و ۰/۰۰۱٪ بروموفنول آبی در
۱/۲۵ mm از TRIS/HCL بود. پروتئین ها شده و از دانه ها توسط تلقیح یا آغستن ۵
دقیقه ای در ۱۰۰ °C رها شدند. پروتئین ها در ژل ۱ c Sds/polyacylamid رها شدند

طبق شرح Laemmli و با آبی روشن Coomassie ، "A" طبق تشریح osborn و Weber یا توسط روش لکه گذاری نقره ای طبق تشریح Dernick و Heukeshofen لکه دار شدند. باندياتوار ارائه گر پروتئین Mr ۳۹۰۰۰ جدا شد و رشته اسید آمینه N-ترمینال توسط تنزل Edman خودکار شده تعیین شد.

میکروسکپی الکترونی

سلولهایی که شسته شده و در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM معلق شدند با گلو تار آلدئید ثابت شده و در رزین با دیسکازیته اندک Spurr گنجانیده شد که طبق شرح Watheer – uanruschtetal است. بخشهای نازک سرب کتراست داده شده و در یک میکروسکوپ الکترونی فیلیپس در بزرگنمایی های کالیبره شده، بررسی شدند.

نتایج

ارگانسیم ها و مشخصات

چهل باکتری گرم - منفی متفاوت که از روغن خام بعنوان تنها منبع انرژی و کربن در پائین استفاده میکروبه از نمونه های آب دریای گرفته شده از ساحل خلیج San Jorge تمامی این ایزوله های دریایی می توانند بعنوان سایکروتروف ها یا میکروارگانسیم های سایکروفیلی در پی تعریف Morita طبقه بندی شوند. بیشتر آنان می توانند در طیف حرارتی 30°C - 0°C رشته نمایند. رشته بیشتر رشته ها بر یونهای سدیم بستگی نداشتند گرچه در حضور ۲٪ کلراید سدیم رشد کردند. شور بودن یا نمک دار بودن آب دریای ساحل خلیج San Jorge بطور نرمال ۳/۵٪ است. هر چه که ایزوله ها غلظت های کلراید سدیم را تا ۵٪ و در برخی موارد تا ۵٪ و در مواردی حتی تا ۸٪ تحمل کردند. بطور کلی مشخصات رده بندی ایزوله ها دشوار بود گرچه باکتری ها متعلق به و *Vibrio* نهایتاً شناسایی شدند.

چندین مولف در شناخت باکتری هایی دریایی کارایی پائین را گزارش کرده و بسیاری آزمایش که برای میکروبیولوژی طبی طراحی شده برای باکتری های یافت شده در این محیط های آبی قابلیت کاربرد ندارند.

شکل گیری مجموعه های انضمام یا ضمام لیپیدی:

سلولهای ایزوله با B سیاه Sunon لکه دار شده و توسط میکروسکوپی نوری جهت تعیین کردن رخداد مجموعه های ضمیمه لیپیدی در سیتوپلاسم در طی پرورش تحت شرایط محدودگر نیتروژن بررسی شدند. هیدروکربنهای مثل آلکانها به انضمام لایه های فرعی غیر هیدروکربن مثل گلوکونات یا استات بعنوان تنها منبع انرژی و کربن برای رشد و برای سنتز لیپیدهای نگهداری مورد استفاده قرار گرفتند. ضمام سلولی سلولها بعداً توسط کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) برای ترکیب شیمیایی شان تحلیل و آنالیز شدند.

تقریباً ۷۳٪ از ایزوله ها قادر به سنتز و متراکم کردن ترکیبات لیپیدی بصورت فوق سلولی تا حدودی بودند. از این باکتری های متراکم گر لیپیدی ۹۳٪ بعنوان ترکیبات اصلی PHA را متراکم کردند. فقط دو ایزوله که بعنوان A شناسایی شدند. دیگر ترکیبات سودانوفیلی نسبت به PHA را سنتز و متراکم کردند مثل استرهای واکسن یا موم چنانکه توسط تحلیل و آنالیز Ge و TLC آشکار شدند. ۱/۳ از تمام باکتریهای متراکم گر PHA یک محتوای پلیمری بالاتر از ۵٪ از وزن خشک سلولی را نشان دادند در حالیکه PHA بالغ بر کمتر از ۵٪ از خشک سلولی در دیگر رشته ها می شد. تراکم PHA توسط گروه دون رشته ها مورد اشاره قرار گرفت و ترکیبات پلی استرهای متراکم در جدول ۱ نشان

داده شده است. باکتری های دریایی به گونه Pseudomonas تعلق دارند که از پلی استری حاوی اسیدهای هیدروکسی آلکانوتیک بطور؟ توسط از لایه های فرعی غیر مرتبط تشکیل می شوند.

که با ۳- هیدروکسی دکانوات بعنوان تشکیل دهنده غالب پلی استر همراه است. در مقابل ایزوله های ۸۵۵ و ۴- PSA قادر به سنتز پلیمری حاوی ۳- هیدروکسی اکتانوات بعنوان تشکیل دهنده اصلی از طبقات یا لایه های فرعی غیر مرتبط بودند. ۳- هیدروکسی اکتانوات نیز ترکیب اصلی رخ دهنده در پلیمر پس از پرورش سلولها بر اکتانوات یا اکتانول بود و ۳- هیدروکسی هگزانوات و ۳- هیدروکسی بوتیرات به انضمام آنها بعنوان اجزای اصلی رخ دادند. در کل فقط بقایای PHA وقتی ایزوله ها بر هیدروکربنها پرورش یافتند. ردیابی شدند. برخی رشته ها مقادیر اندکی از هیدروکربن اصلاح نشده فراهم شده بعنوان منبع کربن در سلولها اگر بر آلکانها پرورش یابند آنهم بعنوان تنها منبع کربن را متراکم کردند.

رابطه بین دما برای رشد و سنتز PHA

تراکم PHA توسط سه رشته سایکروفیلی در سه دمای متفاوت بررسی شد. سنتز و تراکم PHA در این باکتری ها در دماهای پائین رخ دادند. ایزوله های P.۳۱۹ و ۴-PSA حداکثر محتوای PHA پس از پرورش در 4°C در حداقل محتوای پلیمر پس از پرورش

در 4°C و 20°C ردیابی نشد. ترکیب پلی استرهای رشته های مربوطه ثابت در طی رشد در دماهای متفاوت باقی ماندند.

رخداد پلی فسفات :

دو نوع ضمیمه فوق سیتوپلاسمی توسط میکروسکپی الکترونی در سلولهای ایزوله های ۳۱۹ و ۸۸۰ در طی رشد بر گلوکونات ردیابی شدند. ضمائم ضفاف الکترونی به گرده ها یا دانه های PHA ضمائم متراکم الکترونی برمی گردند که اغلب با دانه ها یا گرده های PHA توأم بودند. کل محتوای فسفری کل سلولهای ایزوله ۳۱۹ که بر گلوکونات پرورش یافتند، ۵۵ بود.

مشخصات ایزوله ۲۱۱

ایزوله ۲۱۱ که قادر به متراکم کردن استرهای واکس به صورت غالب بوده با جزئیاتی چند مورد تحقیق قرار گرفت. سلولهای این باکتری گرم - منفی گوی مانند یا کروی شکل بودند که اغلب بصورت جفتی یا زوجی رخ می دادند و هاگها بوجود نمی آمدند و هوای اکسیداز - منفی و کاتالاز مثبت بود آزمایش Of اصلاح شده Liefson تحت شرایط هوازی و غیر هوازی هر دو منفی بود. قندهای مثل گلوکز، فراکتوز ... ساکاروز بعنوان تنها منبع کربن استفاده نمی شدند و لیپاز فوق سلولی بوجود آمد. این خواص این ایزوله را احتمالاً بعنوان عضوی از گونه A. شناسایی کردند. ترکیبات ارگانیک مورد

استفاده توسط این ایزوله در جدول ۲ آمده است. روغن زیتون و اسیدهای ارگانیک مثل اسید استیک و الکل هایی مثل اتانول از رشد سلولها حمایت می کردند. هیچ گونه رشدی بر قندهای بکار رفته در این مطالعه رخ نداد. شکل گیری ضمام فوق سلولی سودانوفیلیک در طی رشد بر لایه های گوناگون فرعی مثل روغن زیتون و استات و اتانول و هپتادکان رخ دادند.

ایزولاسیون و مشخصات شیمیایی ضمام لپیدی A.

عصاره های حاصله از سلولهای A. که به روغن زیتون پرورش یافته (بعنوان تنها منبع کربن) در یک گرادیان ساکاروز منقطع جدا شدند. پس از سانتری فوژ کردن ضمام لپیدی در اوج فاز $0.6M$ ساکاروز ظاهر شدند. مشخصات شیمیایی و تحلیل TLC آشکار کردند که ضمام سلولی از یک ترکیب پیچیده از ترکیبات هیدروفوبیک تشکیل می شدند. استرهای واکس بعنوان اجزای اصلی به اضافه مقادیر جزئی از الکل های آزاد، تری اسیل گلیسرول ها، دی اسیل گلیسرول ها و اسیدهای چرب آزاد در ضمام خالص شده ردیابی شدند. در مقابل ضمام سلولی ناشی از سلولهای رشد یافته بر هگزادکانون فقط از استرهای واکس و الکل های آزاد با طول زنجیره مرتبط با طبقه با لایه فرعی طبق آنچه توسط TLC و GC آشکار شد. تشکیل شدند. پلی هیدروکسی بوتیرات یا دیگر PHA در ضمام خالص شده ردیابی نشدند.

اسیدهای چرب که در ضمائم لیپیدی A رخ می دهند.

الگوهای اسیدهای چرب لیپیدها بر لایه فرعی مورد استفاده بعنوان منبع کربن مثل استات یا اتانول بستگی داشتند. در مقابل اسید چرب غالب که در ضمائم لیپیدی در طی رشد بر روغن زیتون یا هگزاکانون رخ می دادند مستقیماً از اسکلت کربن طبقه فرعی مربوطه مشتق می شد. اسیدهای چربی که از اکسیداسیون B اسیدهای آلکانوئیک مشتق می شدند بعنوان لایه فرعی فراهم شده و حاوی اسکلت کربن کوتاه شده توسط دو اتم کربن که حاضر بودند. اسیدهای چرب حاضر در لیپیدهای متراکم بطور غالب از اسیدهای چرب مستقیم اشباع نشده با طول زنجیره ۱۸-۱۲ اتم کربن تشکیل می شدند.

تحلیل و آنالیز الکتروفورز ژل ضمائم لیپیدی ناشی از A:

ضمائم لیپیدی ناشی از سلولهای رشد یافته بر روغن زیتون در یک ژل پلی آکریل آمید SDS توسط الکتروفورز جهت تحلیل و آنالیز پروتئین های توأم با گرده یا دانه جدا شدند.

پروتئین ها از ضمائم ایزوله شده توسط تلقیح ۵ دقیقه ای در 100°C در حضور SDS قابل حل شدند. یک نوار پروتئینی عمده ارائه گر یک پروتئین تقریباً $39000\text{ }\mu\text{r}$ در تهیه ضمائم ردیابی شد. مضافاً اینکه برخی نوارها یا بانه های جزئی ارائه گر پروتئین های توده مولکولی کمتر نیز در ژل ظاهر شدند. پروتئین توأم با ضمیمه $39000\text{ }\mu\text{r}$ بر غشاء

VDF لکه دار شد و در معرض تنزل Edmann اتومات قرار گرفت و رشته اسیدهای

آئینه ترمینال N- ۹ باقیمانده بدست آمد که بطور غالب از اسیدهای آمینه هیدروفوبیک تشکیل می شد.

مبحث:

میکروارگانسیم های ایزوله شده از خلیج San Jorge و مورد تحقیق و بررسی در این

مطالعه در محیط های سرد باقی نماندند ولی قادر به رشد در دماها پائین بودند. برخی از

ایزوله ها بسیار فرار بودند و درطیف وسیعی از دماها رشد کرده و شوری ها را تحمل کردند.

بیشتر ایزوله ها قادر به تراکم مقادیر متغیری از لیپیدها مثل پلی استرها یا استرهای

واکس پس از پرورش تحت شرایط محدودگر نیتروژن بودند. با نگاهی می تواند از

بقای این باکتری ها تحت شرایط معکوس حمایت کرده و آنان را قادر به واکنش سریع

وقتی شرایط مطلوب حفظ شوند، می نماید. برخی از میکروارگانسیم های مورد بررسی

قادر به متراکم کردن بیش از یک نوع ماده حفظ کننده بطور همزمان می باشند مثل PHA

و پلی فسفات. پلی فسفات نیز بعنوان رزرو انرژی در باکتری ها مدنظر قرار می گیرد.

شرایط محیطی و مکانسیم های تنظیم گر شامل تعیین کردن رزرو اصلی وارد شده است.

رخداد پلی استرها با دیگر ترکیبات لیپیدی بعنوان ماده نگهدارنده در سلولها بنظر می

رسد ویژگی رخ دهنده باکتری های دریایی سایکروفیل بوده و بنابراین برای این باکتری ها از اهمیت زیادی برخوردار است. رخدادهای یک یا چند نوع از ترکیبات نگهداری در سلولها می تواند آنها را با مزیت برای بقایشان در محیط هایی با شرایط دارای نوسان تأمین کند.

پلی استرها ترکیبات نگهداری متراکم شده توسط باکتری های دریایی ایزوله شده در این مطالعه هستند. ترکیب پلی استرهای متراکم شده از لایه های فرعی غیر مرتبط یا از اکتانوات و اکتانول توسط باکتری های دریایی متعلق به گونه P برای *Pseudomonas oeruginosa* و دیگر متعلقات P برای گروه I همولوژی rRNA معمول بودند. سنتز و تراکم PHA بصورت محیطی در دماهای پائین در این باکتری ها رخ داده و مقادیر قابل توجهی از PHA در 4°C و 20°C بوجود آمدند. این نشان داد که سینتاز PHA این میکروارگانیسم ها که آنزیم کلیدی در سنتز PHA قادر به عملکرد در طیف وسیعی از دماها است و نیز در دماهای پائین فعال باقی می ماند. این نکته مورد تحقیق نگرفته که آیا محتوای کمتر PHA پس از پرورش سلولها 30°C بنا به فعالیت سینتاز PHA کمتر است یا فعالیت کمتر دیگر آنزیم ها.

ایزوله سایکروفیل که بعنوان A شناسایی شد، قادر به تولید لیپیدهایی بود که بصورت فوق سلولی بعنوان ضمام متراکم شد در زمانی که سلولها بر منابع گوناگون

کربنی تحت شرایط محدودگیر نیتروژن پرورش می یافتند. الکل هایی مثل اتانول و هگزادکانول و ... روغن زیتون بعنوان تنها منبع انرژی و کربن برای رشد و برای سنتز لیپیدها مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیب شیمیایی ضمامم لیپیدی تحت تأثیر منبع کربن قرار داشتند.

ضمامم سلولی جدا شده از سلولهای رشد یافته از روغن زیتون حاوی ترکیب پیچیده ای از ترکیبات هیدروفوبیک همانند استرهای واکس (موم) و .. و الکل های آزاد و اسیدهای چرب بودند. در مقابل ضمامم ناشی از سلولهای رشد یافته از هگزادکانول حاوی استرهای واکس بعنوان اجزای عمده به اضافه مقادیر جزئی از هگزادکانول بودند. Singeretal رخداد ضمامم سلولی با ترکیب بسیار مشابه با هگزا دسیل پالمیتات بعنوان ترکیب اصلی به اضافه مقادیر جزئی از هگزادکانول و فسفولیپیدها زمانیکه سلولهای A. رشته Hol-N بر هگزادکانول پرورش می یافتند را گزارش کردند. Fixtenetal نشان داد که استرهای واکس همانند ستیل پالمیتات اجزای نگهداری انرژی در گونه A هستند. ایزوله مورد استفاده در این مطالعه قابلیت استفاده از ستیل پالمیتات بعنوان تنها منبع کربن و منبع انرژی را داشت. این امر نشان داد که استرهای واکس به انضمام دیگر لیپیدهای مترکم شده توسط ایزوله می توانندن بمتابه محصولات نگهداری ، عمل نمایند.

پروفیل متراکم اسید چرب در طی رشد بر طبقات و لایه های فرعی گوناگون، رخداد مسیره های گوناگون برای لیپیدهایی که در سلولها محاط میشوند، را نشان داد. از اتانول و استات، اسید پالمیتیک بطور نرمال اسید چرب غالب لیپیدهای سلولی بود. این اسید هم چنین اسید چرب غالب تولید شده توسط رشته ۶۳۰ PD مربوط به R-Opacus از پرورش بر منابع کربن بدون ارتباط است، همچنانکه قبلا گزارش شده بود این باکتری گرم - مثبت قادر به سنتز مقادیری اسید چرب با شماره های فرد میان اسیدهای چرب متراکم که در طی پرورش بر گلونات یا استات بود. اسیدهای چرب با شماره فرد بطور نرمال توسط باکتری هایی که از پروپیدنیل CoA- برای مسیر بیوستنز اسید چرب استفاده می کنند، سنتز می شوند.

باکتری های متعلق به Rhodococcus یا No Cardia قادر به تولید مقادیری پروپیونیل CoA- از منابع کربن غیر مرتبط از طریق مسیر متیل مالونیل CoA- همچنانکه در R.ruber گزارش شده است، می باشند.

در مقابل A. فقط اسیدهای چرب اشباع شده و نشده با شماره های زوج را پس از رشد بر طبقات فرعی غیرمرتبط متراکم می کرد. این یافته ها با پروفیل اسید چرب که در سلولهای A.colcoaceticus طبق تشریح Fixteretal رخ می دهند، در یک راستا هستند. اسیدهای چرب در سلولهای رشد یافته اتانول یا استات از ایزوله C₁₁ احتمالاً با استفاده از

استیل CoA- بعنوان پیشرو یا سنتز شدند، پروپینیل CoA- آشکارا توسط ایمنی باکتری شکل گرفت.

وقتی روغن زیتون، هگزادکانول و هپتادکان بعنوان تنها منبع کربن استفاده شدند، طول زنجیره اسید چرب مخاط که در ضمائم رخ می دهند دارای ارتباط متقابل با آن لایه فرعی است. این نتایج رخداد اکسیداسیون مونوترمینال آلکان یا لایه فرعی الکل با اسیدچرب مربوطه آن و محصولات اکسیداسیون که بعداً در ضمایم لیپیدی جمع میشوند را نشان میدهند. مضافاً اینکه رخداد اسیدهای چرب اشباع نشده به طول زنجیره ترکیبات بکار رفته بعنوان منبع کربنی بی می گشت مثل هگزادکانون یا هپتادکان و حضور سیستم desaturase اسید چرب در این میکروارگانیسم در طی رشد براین لایه ها یا طبقات فرعی را نشان می داد. اسیدهای چربی که از آنان دو یا چند اتم کربن توسط اکسیداسیون B- انتقال یافتند نیز در ضمایم لیپیدی قرار گرفتند. این امر نشان داد که در طی رشد به الکل ها یا آلکانهای با زنجیره طویل سنتز اسید چرب دچار مانع شده یا فقط در نرخ پائین رخ می دهد. این یافته توسط Sampsonf Finnerty برای یک رشته (A.) Acinobactersp در طی رشد بر هگزادکان گزارش شد و نیز در رشته PD۶۳۰ مربوط به R.opacus پس از رشد بر آلکانهای با زنجیره طویل متفاوت مثل پنتادکان و هگزادکان و ... مشاهده شد. وقتی روغن زیتون بعنوان تنها منبع کربن و انرژی بکار رفت، اسید

اکتادسنوئیک ، احتمالاً اسید اولئیک ، اسید چرب عمده رخ دهنده در لیپیدها بود. روغن زیتون ترکیبی از آسیل گلیسرولها با محتوای از اسید اولئیک است. ترکیب شیمیایی ضمائم لیپیدی و توان ایزوله جهت تولید لیپاز خارج سلولی رخدادهای هیدرولیز خارج سلولی روغن زیتون و سنتز متعاقب لیپیدهای نگهدارنده ای که از اسیدهای چرب رها شده از روغن زیتون استفاده می کنند و از محیط یا واسطه جذب می شوند را نشان داد.

ضمائم لیپیدی سلولی احتمالاً ساختار قطعی اجزایی را دارند که اجازه پایداری لیپیدها در سیتوپلاسم آبکی را می دهند. رخدادهای پروتئین های خاص در لیپید یا ضمایم PHA که نقش ساختاری در ضمائم داشته و احتمالاً سایت های اتصال خاص برای آنزیم های درگیر در سنتز لیپیدهای موجود در ضمائم دارند، گزارش شده است. به این گونه پروتئین ها بعنوان oleosins یا phasins ، با توجه به اینکه آیا آنان در سطح مجموعه های بذر روغن در گیاهان رخ دهند یا در سطح ضمایم PHA در باکتری ها رخ دهند یا نه ، اطلاق می گردد. آنزیم های درگیر در بیوسنتز و تنزل لیپیدهای نگهداری شده نیز می توانند به ضمایم لیپیدی A متصل شوند، چنانکه برای گرده های PHA در باکتری های تعیین شده عملکرد پروتئین های توأم با ضمایم A کماکان ناشناخته است. و در آینده مورد تحقیق و بررسی قرار خواهد گرفت.