



Title	海洋細菌の脂質に関する研究： . 海洋型の菌株の脂質について
Author(s)	国本, 正彦
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 25(4), 342-350
Issue Date	1975-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23541
Type	bulletin (article)
File Information	25(4)_P342-350.pdf



[Instructions for use](#)

海洋細菌の脂質に関する研究

II. 海洋型の菌株の脂質について

国本正彦*

Lipids of Marine Bacteria

II. Lipid composition of bacteria of marine type

Masahiko KUNIMOTO*

Abstract

The lipid compositions of nine strains of marine and terrestrial types were determined. Results show that nonconjugated lipids, consisting mainly of free fatty acid and wax, and occurring among the strains of the marine type differed greatly from those of the strains of the terrestrial type. Among the strains of the marine type, free fatty acid and wax occurred in significant quantities. But no other bacteria containing them abundantly has been found except in a few cases.

The predominant phospholipids were phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol in all examined strains.

The fatty acid compositions of some lipids were also investigated. Results show that odd number fatty acids were present in significant proportion in many strains of the marine type, and this finding is surprising since no bacterium that has such composition has been hitherto known.

This suggests that the strains of marine and terrestrial types may be reasonably distinguished with lipid composition.

緒言

海洋細菌の脂質に関する報告は少く、Gordon・MacLeod¹⁾、De Voe・Oginsky²⁾、Eberhard・Rouser³⁾ および Oliver・Colwell⁴⁾ の報告がみられるのみである。前報⁵⁾ で、著者らは海洋より分離した菌株であって、かつ、Hidaka・Sakaiの Salt Requiring Test⁶⁾ により海洋型に分別された *Achromobacter* sp. 60-20-A-5 の脂質を検討した結果、この菌株は遊離脂肪酸と wax を主成分とする非複合脂質の含量が多く、全脂質の 22.5% に達し、グラム陰性菌としては特異な脂質組成を示した。また、これら脂質の構成脂肪酸も直鎖の奇数酸の割合が高く、現在まで、他の細菌には知られていない脂肪酸組成をもつことを明らかにしたが、本実験では、海洋型の *Pseudomonas*、*Achromobacter* および *Vibrio* の脂質組成と陸型の *Escherichia coli* および *Pseudomonas fluorescens* の脂質組成とを比較検討した結果、海洋型の菌株は特異な脂質組成を示した。本文に入るに先立ち、本研究について終始御懇篤なる御指導を賜った北海道大学水産学部五十嵐久尚教授、座間宏一博士、並びに菌株の分与と有益

* 北海道大学水産学部食品化学第一講座
(Laboratory of Food Chemistry I, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

国本： 海洋細菌の脂質-II

な御助言・御教示を頂いた本学水産学部坂井稔教授に深甚なる謝意を表す。また、ガス・マススペクトルを測定された日立製作所応技部秋森伯美氏に厚く御礼申し上げる。

実 験

供試菌株および培養：

供試菌株は表1に示すように、海洋型の菌株である *Pseudomonas* sp. 4 菌株, *Achromobacter* sp. 2 菌株, *Vibrio* sp. および陸型の菌株である *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* の 9 菌株である。

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Type	Source
<i>Pseudomonas</i> sp. 1-17	M*	Seawater
" 10-55	"	"
" 1055-1	"	"
" 2E10	"	"
<i>Achromobacter</i> sp. 2E4	"	"
" 3-48	"	"
<i>Vibrio</i> sp. 12-18	"	"
<i>Escherichia coli</i> Es-1	T**	HPPHL***
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps-12	"	EFDL****

* Marine type, ** Terrestrial type, ***Hiroshima Prefectural Public Health Laboratory, **** East Fish Disease Laboratory, N.J., U.S.A.

海洋型の菌株には ZoBell 2216E 培地⁷⁾, 酵母エキス (大五栄養 K.K) 1g, ポリペプトン (大五栄養 K.K) 5g, 寒天 (極東製薬 K.K) 15g, Herbst の人工海水 1l, およびこの培地から寒天を除いた液体培地を用いた。

陸型の菌株には ZoBell 2216E 培地の人工海水を蒸留水に置き代えたものを用いた。それぞれの培地は N-NaOH で pH を 7.8 にした。

Pseudomonas sp. 1-17, 10-55 および *Achromobacter* sp. 2E4 は斜面培地に 25°C で 3 日間前培養した後、平板培地に塗沫し、さらに、25°C で 3 日間培養後、集菌した。その他の菌株は液体培地に 25°C で振盪培養し、初期定常期に集菌した。海洋型の菌株は人工海水で、陸型の菌株は蒸留水で菌体を洗浄した後、凍結乾燥して脂質の抽出に供した。

脂質の抽出：

粗脂質の抽出は凍結乾燥菌体に同量の水を加え、20 倍量のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で抽出し、残渣は、さらに、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で抽出を 4 回繰り返した。これらの抽出液から溶剤を減圧留去した後、粗脂質を少量のクロロホルム-エタノール-水 (800:200:25, v/v) に溶解し、前報⁵⁾ と同様に、セルロース (Whatman CF11) カラムで精製し、全脂質を得た。

また、脂質の抽出法を検討するため、*Pseudomonas* sp. 2E10, 1055-1 および 7-17 の菌体より Sehgal らの方法⁸⁾ を改良した方法⁵⁾ で得た脂質量と本法で得た脂質量を比較検討した。

ケイ酸カラムによる脂質の分画：

全脂質は少量のクロロホルムに溶解した後、ケイ酸 (Mallinckrodt, 100 メッシュ) カラムに注加し、

保持容量の7倍量のクロロホルムで非複合脂質を5倍量のメタノールで複合脂質に分画した。

DEAE-セルロースカラムによる複合脂質の分画:

複合脂質は少量のクロロホルム-メタノール (7:1, v/v) に溶解した後, DEAE-セルロース (Brown, アセテート型) に注加し, 保持容量の2倍量のクロロホルム-メタノール (7:1, v/v) で未知物質, クロロホルム-メタノール (7:3, v/v) でホスファチジルエタノールアミン (以下, PE と略す), メタノールでリゾホスファチジルエタノールアミン (以下, Lyso-PE と略す), アンモニア水飽和クロロホルム-メタノール (4:1, v/v) でホスファチジルグリセロール (以下, PG と略す) およびカルジオリピン (以下, CL と略す) に分画した。

薄層クロマトグラフィー (以下, TLC と略す) による脂質の検討:

Silica gel G (Merck) の薄層を用い, 非複合脂質は n-ヘキサン-エーテル-酢酸 (90:10:1, v/v) で, 複合脂質はエーテル-アセトン (1:1, v/v) で展開後, さらに, クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (60:30:2:1, v/v) で再度展開した。

脂質の検出は50% 硫酸で, リンはDittmer 試薬, アミノ基はニンヒドリン試薬, 糖はアンスロン試薬, コリンはDragendorff 試薬で検出した。脂質組成は50% 硫酸で発色後, Ozumor 82 型デンシトメーターにより測定した。

脂質構成脂肪酸のガスクロマトグラフィー (以下, GLC と略す) およびガスマススペクトル法による検討:

脂質構成脂肪酸は塩酸-メタノールおよびジアゾメタンでメチル化し, 表 2-a) に示す条件でガスクロマトグラフィーを行い, 半値巾法で各ピークの面積を求め, 相対面積比較法で組成を求めた。*Pseudomonas* sp. 2E10 の各構成脂肪酸はガスマススペクトル法により確認し, この脂肪酸を標準として, 他の菌株の脂肪酸を同定した。ガスマススペクトルの測定は日立製作所応技部に依頼して行ない, その条件は表 2-b) に示す。

Table 2. Operating conditions of gas-liquid chromatograph and mass measurement.

a) Gas-liquid chromatograph	
Instrument	: Hitachi Perkin-Elmer F6-D
Column	: 10% DEGS, 3 mm×1.5 m glass column
Carrier gas	: N ₂ 0.5 kg/cm ²
Detector	: Hydrogen flame ionization detector
Column Temp.	: 170°C
Injection Temp.	: 250°C
b) Mass measurement	
Instrument	: RMU-6MG
Column	: 2% DEGS, 3 mm×1 m glass column
Oven Temp.	: 130-180°C Program rate 5°C/min
Injector Temp.	: 250°C
Separator Temp.	: 280°C
Carrier gas	: He, 1.2 kg/cm ²
Ionizing Voltage	: 20 eV
Accelating Voltage	: 3.2 kV (m/e max. 1500)
Ion Source Temp.	: 200°C
TIM Sensitivity	: 10 Recorder mV. 0.5 V.

Poly- β -hydroxybutyrate: の分画および同定:

全脂質を少量のクロロホルムに溶解した後、4倍量のメタノールを加え、生じた沈殿を遠心分離により集める。これを、さらに、少量のクロロホルムに溶解し、メタノールを加えて再沈殿させ、poly- β -hydroxybutyrate を分取した。このものはクロトン酸誘導体とした後、235 m μ の吸収から同定した⁹⁾。

菌体の灰分含量:

菌体を電気炉で灰化し、重量法により灰分含量を求めた。

脂質含量:

脂質含量は、すべて、無灰菌体に対する含量として表わした。

結果および考察

本実験で用いた凍結乾燥菌体より脂質を抽出する方法および前報⁹⁾ で用いた Sehgal らの方法を改良した方法で抽出した脂質量は表3に示すように、差が認められず、本実験で用いた方法は簡便で有効な方法であると考えられる。

各菌株の脂質含量は表4に示すように、5.7~12.8%で、菌株により含量が異っている。Achromobacter sp. 3-48の脂質にはpoly- β -hydroxybutyrateが53.9%含まれるが、このものは他の脂質成分とは性質が異なるため、ここでは対象としなかった。

これらの全脂質をケイ酸カラムで非複合脂質と複合脂質に分画した結果、表4および図1に示すように、海洋型の菌株の非複合脂質画分は全脂質の10~30%であり、陸型の菌株の3.1~4.9%に比べ、海洋菌の菌株は非複合脂質の占める割合が多い。一方、複合脂質画分の占める割合は陸型の菌株で多く、海洋型の菌株では少ない。

一般にグラム陰性菌では、複合脂質が脂質の主成分であり、非複合脂質は全脂質の数%に過ぎないが、本実験に用いた海洋型の菌株では非複合脂質の占める割合が高く、特に、Pseudomonas 属の菌株ではその傾向が著しい¹⁰⁻¹²⁾。

非複合脂質画分をTLCで分析した結果は表4、図2-a)および図3に示すように、陸型の菌株ではCoenzyme Qが非複合脂質画分の大半を占め、waxは存在せず、遊離脂肪酸(以下、F.F.A.と略す)もごく少量で、グラム陰性菌に一般的に認められる結果と一致した¹⁰⁻¹²⁾。しかし、海洋型の菌株ではF.F.A.およびWaxの含量が多く、これらの含量の最も少ないAchromobacter sp. 3-48でも全脂質の6.5%を占め、多いPseudomonas sp. 1055-1およびVibro sp. 12-18では20.8%、19.4%に達した。

Pseudomonas sp. 2E10の複合脂質の分別例を図4および図2-b)に示し、また、複合脂質をDEAE-セルロースカラムおよびTLCでPE, PG, Lyso-PE, CLなどの各成分に分別、定量した結果は表4

Table 3. Yield of the lipids from some strains by two methods. Data presented in percentage on the wet weight of the cell.

Strain	2E10		1055-1		7-17	
	I	II	I	II	I	II
Crude lipids content	0.82	2.30	1.14	2.88	1.14	1.16
Total lipids content	0.73	0.75	1.09	1.08	1.05	1.01

* Method I: Modified method of Sehgal et al.

Method II: Method by which the lipids were extracted from the lyophilized cells.

Table 4. Composition of the lipids from the

Strain	Total lipid	Nonconjugated lipid	Conjugated lipid	F.F.A.	wax
1-17	8.4	24.6	75.4	6.5	3.7
10-55	5.7	30.6	69.4	9.7	10.1
1055-1	10.5	29.2	70.8	20.2	0.6
2E10	6.9	15.8	84.2	7.2	5.0
2E4	6.1	10.4	89.6	6.3	1.8
3-48	12.8*	10.1	89.9	5.2	1.3
12-18	8.8	29.7	70.3	17.7	1.7
Es-1	8.9	3.1	96.9	0.1	—
Ps-1	8.4	4.9	95.1	1.6	—

* contained 6.9% of poly- β -hydroxybutyrate
 Abbreviations for lipids are: F.F.A. Free fatty acid; Co Q, Coenzyme Q; PE,

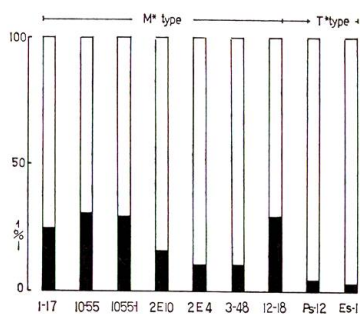


Fig. 1. Composition of nonconjugated and conjugated lipids from the studied strains.

■: Nonconjugated lipids,
 □: Conjugated lipids.
 *M type: Marine type, T type: Terrestrial type.

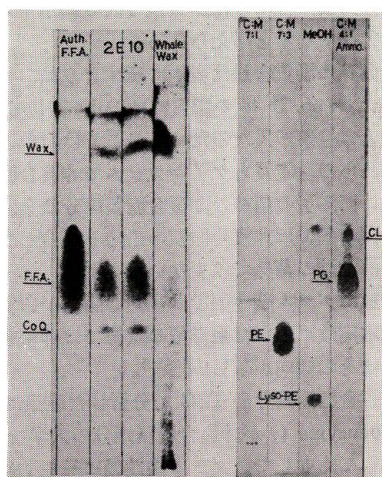


Fig. 2. Thin layer chromatogram of nonconjugated and conjugated lipids from *Pseudomonas* sp. 2E10

a) Nonconjugated lipids.
 b) Conjugated lipids.
 Chromatographic solvents are described in experimental methods. Lipids detected with 50% H_2SO_4 .

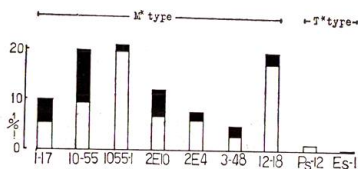


Fig. 3. Composition of free fatty acid and wax from the studied strains.

□: Free fatty acid, ■: Wax
 *M type: Marine type, T type: Terrestrial type.

国本: 海洋細菌の脂質-II

studied strains. Data presented in percentage.

Co Q	Uk	PE	PG	Lyso-PE	CL	Uk
8.9	5.5	41.1	21.0	0.6	1.1	11.6
6.4	4.4	39.2	15.8	3.8	3.5	7.1
6.1	2.3	33.5	17.9	6.6	+	12.8
1.8	1.8	51.3	26.0	2.0	0.5	4.4
0.7	1.6	65.2	20.9	1.1	1.6	0.8
1.8	1.8	23.5	42.4	—	6.6	17.4
4.1	6.2	48.3	8.7	0.7	4.0	8.6
1.6	1.4	74.7	16.4	0.4	3.2	2.2
3.1	0.2	66.2	14.4	0.5	8.0	6.0

Phosphatidylethanolamine; PG, Phosphatidylglycerol; Lyso-PE, Lyso-Phosphatidylethanolamine; CL, Cardiolipin; Uk, Unknown.

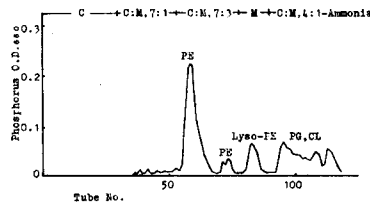


Fig. 4. DEAE-cellulose column chromatogram of conjugated lipids from *Pseudomonas* sp. 2E10.

Sample 130.9 mg
 DEAE-cellulose (Acetate type) 20 g
 Holding volume 200 ml. Each collection 15 ml
 Temperature 4°C
 Solvent system: Chloroform-Methanol (7:1, v/v) 400 ml
 Chloroform-Methanol (7:3, v/v) 400 ml, Methanol 300 ml,
 Chloroform-Methanol (4:1, v/v)-saturated with 27% Ammonia 500 ml.
 Abbreviations for lipids are: PE, Phosphatidylethanolamine;
 PG, Phosphatidylglycerol; Lyso-PE, Lyso-Phosphatidylethanolamine; CL, Cardiolipin.

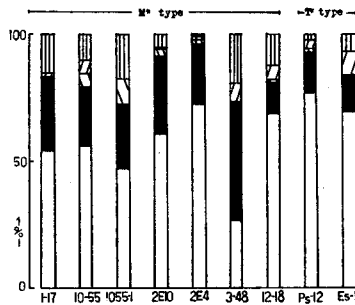


Fig. 5. Lipids composition of conjugated lipids from the studied strains.

□: Phosphatidylethanolamine, ■: Phosphatidylglycerol,
 ▨: Lyso-Phosphatidylethanolamine, ▩: Cardiolipin, ▒: Unknown.
 *M type: Marine type, T type: Terrestrial type.

Table 5. Fatty acid composition of some lipids from the

Strain Cn: m	1-17			10-55			1055-1			2E10		
	F.F.A.	PE	PG	F.F.A.	PE	PG	F.F.A.	PE	PG	F.F.A.	PE	PG
14:0	—	—	—	—	—	—	1.1	1.3	1.0	1.1	—	—
14:1	—	—	—	—	—	—	—	1.6	1.5	1.1	1.5	1.2
15:0	5.7	7.6	6.7	10.5	8.5	6.5	10.1	4.2	4.0	9.0	10.5	10.4
15:1	9.4	15.1	13.9	8.6	12.1	8.6	5.3	6.0	2.9	7.8	13.7	10.6
16:0	9.1	7.9	5.0	12.1	8.4	5.5	18.6	14.2	14.2	16.6	19.8	16.9
16:1	13.7	23.4	28.4	19.5	25.0	27.5	21.1	4.8	35.7	48.9	28.9	31.8
17:0	7.6	8.5	6.6	14.4	10.1	7.9	11.9	5.9	6.9	5.5	6.7	7.0
17:1	19.1	31.3	34.6	28.3	31.3	38.1	16.3	15.5	17.2	7.7	7.1	9.6
18:0	1.0	—	1.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18:1	5.2	1.8	2.4	5.2	2.2	2.9	4.7	9.8	8.2	1.7	2.8	1.9
19:1	28.1	1.4	—	—	—	1.0	—	—	—	—	—	—
20:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Branched chain fatty acid.

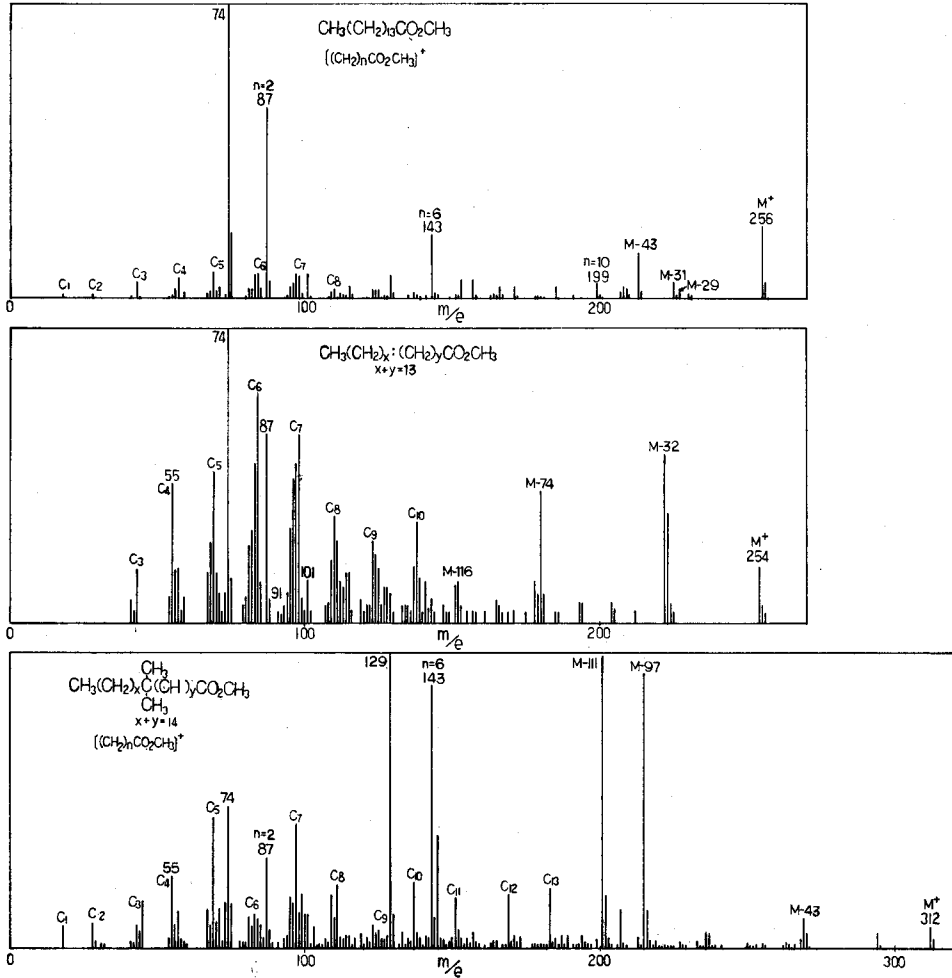


Fig. 6. Mass spectra of fatty acids from *Pseudomonas* sp. 2E10. Operating conditions are given in Table 2-b).

国本：海洋細菌の脂質-II

studied strains. Data presented in percentage.

2E4			3-48			12-18			Es-1		Ps-12	
F.F.A.	PE	PG	F.F.A.	PE	PG	F.F.A.*	PE*	PG*	PE	PG	PE	PG
—	—	—	1.3	—	—	5.0	4.6	4.1	1.6	1.2	—	—
—	—	—	1.6	—	—	8.2	6.9	3.5	—	—	—	—
10.0	9.0	7.8	—	—	1.7	1.8	1.2	1.1	1.3	1.2	—	1.2
16.0	13.8	10.9	—	—	—	1.1	1.7	1.2	—	—	—	—
8.6	8.8	6.7	21.7	8.8	19.4	20.1	23.9	21.1	31.1	28.9	27.9	20.1
25.4	23.0	24.5	7.3	3.9	5.2	56.8	56.0	60.7	21.1	19.1	21.6	19.4
8.2	11.0	9.0	1.8	—	1.7	—	—	1.1	2.9	2.2	1.3	1.2
25.9	28.8	34.9	1.2	1.1	2.0	1.0	1.1	2.0	4.2	3.0	17.4	30.9
—	—	—	6.7	—	—	2.7	—	—	—	—	—	—
3.0	2.3	4.1	49.2	84.1	64.8	1.5	4.0	5.2	29.9	39.6	22.9	16.4
—	—	—	—	—	—	1.0	—	—	—	—	—	3.1
												2.2

および図5に示すように、*Achromobacter* sp. 3-48を除き、海洋型および陸型のいずれの菌株も PE が最も多く、PG と合わせて、複合脂質の80%以上を占めており、グラム陰性菌に広く見られる脂質組成のパターンを示し¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾、著しい差異は認められなかった。

Pseudomonas auruginosa ではホスファチジルコリンおよび糖脂質を¹⁰⁾¹⁴⁾、*Pseudomonas fluorescens* ではホスファチジルコリンを検出した報告があるが¹²⁾、本実験で用いた *Pseudomonas* 属の菌株には、これらの脂質は検出されなかった。

以上のことから、海洋型と陸型の菌株の脂質組成の差異は非複合脂質に認められ、複合脂質には認められなかった。また、陸型の菌株では脂質のほとんどが複合脂質であることから、菌体内における脂質の生理的役割を負っているものは、主として、複合脂質であると考えられるのに対し、海洋型の菌株では、非複合脂質、特に、F.F.A. および Wax の含量が多いことから、これらも複合脂質と同様に生理的役割を持つことが推測された。

各菌株の脂質構成脂肪酸は GLC により分析し、標準物質の t_R と equivalent chain length value から C_{12} ~ C_{20} の飽和酸および不飽和酸からなることが認められた。また、*Pseudomonas* sp. 2E10 の各脂肪酸をガスマススペクトル法により確認同定し、これを標準として他の菌株の脂肪酸の同定を行った。

Pseudomonas sp. 2E10 の脂質構成脂肪酸は C_{12} ~ C_{18} の直鎖飽和脂肪酸、 C_{12} ~ C_{18} の直鎖モノエン酸および C_{19} の側鎖脂肪酸よりなることが明らかになった。この菌株の脂質構成脂肪酸より得られた C_{15} 飽和脂肪酸メチル、 C_{15} モノエン酸メチルおよび構造未決定の C_{19} 側鎖脂肪酸メチルのマススペクトルを図6に示す。

各菌株の PE、PG および F.F.A. の構成脂肪酸組成を表5に示す。陸型の菌株の F.F.A. は含量が少いため、分析は行なわなかった。

Vibrio sp. 12-18 の脂質構成脂肪酸は IR-スペクトルで側鎖に由来する 2370 cm^{-1} の吸収が認められることおよび GLC の結果から C_{12} ~ C_{18} の側鎖脂肪酸よりなるものと推測される。

これらの結果から、陸型の菌型の菌株の脂質構成脂肪酸は、主として、直鎖の $C_{16:0,16:1}$ および $C_{18:1}$ 酸からなっており、グラム陰性菌に特徴的な脂肪酸組成を示しているが、海洋型の菌株では、陸型の菌株にみられるような脂肪酸組成を持つ *Achromobacter* sp. 3-48 および側鎖酸からなる *Vibrio* sp. 12-18 を除き、他の菌株は直鎖の奇数酸の割合が高く、現在まで知られていない脂肪酸組成を示している¹⁰⁾。

要 旨

海洋型の菌株の特異性を明らかにするため、海洋型の *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. および *Vibrio* sp. の脂質を陸型の *Escherichia coli* および *Pseudomonas fluorescens* の脂質と比較検討し、次の結果を得た。

- (1) 陸型の菌株では、F.F.A. は少量しか存在せず、Wax は存在しないが、海洋型の菌株では、F.F.A. および Wax の含量が多いことが認められた。
- (2) 陸型および海洋型の菌株の複合脂質は、いずれも、PE, PG, Lyso-PE および CL からなっており、両者におけるこれらの組成に著しい差異は認められなかった。
- (3) 陸型の菌株の脂質構成脂肪酸は C_{16:0,16:1} および C_{18:1} が主成分で、グラム陰性菌に特徴的な組成を示すが、海洋型の菌株は、2 菌株を除き、C₁₅, C₁₇ の奇数酸の割合が多く、細菌には現在まで知られていない脂肪酸組成を示すことが認められた。

引 用 文 献

- 1) Gordon, R.C. and MacLeod, R.A. (1966). Mg⁺⁺ phospholipids in cell envelopes of a marine and a terrestrial *Pseudomonad*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 684-690.
- 2) De Voe, I.W. and Oginsky, E.L. (1969). Cation interaction and biochemical composition of the cell envelope of a marine bacterium. *J. Bacteriol.* **98**, 1368-1377.
- 3) Eberhard, A. and Rouser, G. (1971). Quantitative analysis of the phospholipids of some marine bioluminescent bacteria. *Lipids.* **6**, 410-414.
- 4) Oliver, J.D. and Colwell, R.R. (1973). Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: Phospholipid composition. *J. Bacteriol.* **114**, 897-908.
- 5) Kunitomo, M., Zama, K. and Igarashi, H. Lipids of marine bacteria: Lipid composition of marine *Achromobacter* sp. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **25**, 332-341.
- 6) Hidaka, T. and Sakai, M. (1968). Comparative observation of the inorganic salt requirements of the marine and terrestrial bacteria. Proc. U.S.-Japan Seminar, Marine Microbiol., *Bull. Misaki. Marine Biol. Inst., Kyoto Univ.* 125-149.
- 7) ZoBell, C.E. (1941). Studies on marine bacteria: I-The cultural requirements of heterotropic aerobes. *J. Mar. Res.* **4**, 42-75.
- 8) Sehgal, S.H., Kates, M. and Gibbons, N.E. (1962). Lipids of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 69-81.
- 9) Law, J.H. and Slepecky, R.A. (1961). Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**, 33-36.
- 10) Kates, M. (1964). Bacterial lipids. *Advan. Lipid Res.* **2**, 17-90.
- 11) Asselineau, J. (1962). *The Bacterial Lipids*. 375 p. Holden-Day, Inc., San Francisco.
- 12) Cullen, J., Phillips, M.C. and Shipley, G.G. (1971). The effects of temperature on the composition and physical properties of the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. J.* **125**, 733-742.
- 13) Ikawa, M. (1967). Bacterial phosphatides and natural relationship. *Bacteriol. Rev.* **31**, 54-64.
- 14) Randle, C.L., Albro, P.W. and Dittmer, J.C. (1969). The phosphoglyceride composition of gram-negative bacteria and the changes in composition during growth. *Biochem. Biophys. Acta.* **187**, 214-220