

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (6) :719 - 724; 4 June 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140171

## 甲苯胁迫下有机溶剂耐受菌 *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanesis* E13<sup>T</sup> 膜脂肪酸的变化

郑昫昫, 陈茂娇, 王敏, 彭惠\*

安徽大学生命科学学院, 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230039

**摘要:**【目的】探讨目前唯一具有有机溶剂耐受性的嗜热细菌新物种 *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanesis* E13<sup>T</sup> 甲苯胁迫下膜脂肪酸的变化。【方法】在不同条件下培养菌株 E13<sup>T</sup>, 收集细胞, 提取脂肪酸, 采用气相色谱-质谱 (GC-MS) 对脂肪酸进行定量测定分析。【结果】0.3% (V/V) 甲苯胁迫下生长时, 菌株 E13<sup>T</sup> 是在从延滞期进入初始生长的时刻显著上调饱和直链脂肪酸含量, 然后随着菌体的生长, 饱和直链脂肪酸的含量持续减少; 在 100% 甲苯幸存实验中, 菌株 E13<sup>T</sup> 的饱和直链脂肪酸的增加幅度更为显著。【结论】与常温下的有机溶剂耐受菌一样, *A. flavithermus* ssp. *yunnanesis* E13<sup>T</sup> 也是通过调节细胞膜上的脂肪酸, 促使细胞膜变硬以抵御甲苯毒性。但是它是通过调节饱和直链脂肪酸, 而不是像常温下的有机溶剂耐受菌那样调节不饱和脂肪酸。

**关键词:** *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanesis* E13<sup>T</sup>, 有机溶剂耐受菌, 直链脂肪酸, 支链脂肪酸, 甲苯  
**中图分类号:** Q556      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0719-06

有机溶剂对微生物具有毒性, 尤其像甲苯、苯这种强毒性的极性有机溶剂, 通常 0.1% (V/V) 的浓度就能抑制或杀死绝大部分微生物。自然界中存在一类有机溶剂耐受菌 (Organic Solvent-Tolerant Bacterium), 它们能够依赖体内某种独特的耐受机制在高浓度的有机溶剂环境下幸存或正常生长。因此, 有机溶剂耐受菌被认为是一种新型的极端微生物<sup>[1]</sup>。近几年, 这种新型极端微生物还在修复有机化工污染的环境、生物转化生产毒性化学品、医药中间体和生物质能源等方面显示了很大的应用前景<sup>[2-3]</sup>。

目前, 有机溶剂耐受菌的机制研究都是在常温

菌中开展的, 特别是能耐受极性有机溶剂的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的细菌。报道过的有机溶剂耐受机制包括: 细胞膜上脂肪酸的成分/含量的适应性调节、细胞内的溶剂降解、溶剂的泵出系统、形成生物膜、细胞外膜结构调整、细胞体积增大等<sup>[4-7]</sup>。其中, 由于细胞膜是抵御有机溶剂损伤的第一道屏障, 因此, 细胞膜上脂肪酸成分的调节在很多有机溶剂耐受菌中发挥了重要的作用<sup>[4-5,8]</sup>。这些常温有机溶剂耐受菌往往含有较高的不饱和脂肪酸, 它们通过调节不饱和脂肪酸的含量或是调节顺式/反式不饱和脂肪酸的比例<sup>[8-12]</sup>, 实现对细胞膜坚硬度的调节, 进而抵御有机溶剂。

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31270081, 31140061, 30800010)

\* 通信作者。Tel: +86-510-5107224; E-mail: pph0259@126.com

**作者简介:** 郑昫昫 (1990 -), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为极端微生物的生理代谢。E-mail: zhengyunyun123@126.com

**收稿日期:** 2014-04-04; **修回日期:** 2015-01-13

*Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* 是我们分离鉴定的目前唯一具有有机溶剂耐受性的严格嗜热细菌亚种<sup>[13-14]</sup>。它不仅能在 55℃ 高浓度的有机溶剂胁迫下正常生长,还能在 100% 有机溶剂覆盖中幸存。与常温下的有机溶剂耐受菌的脂肪酸不同,*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 不含有饱和和脂肪酸,细胞膜上的 9 种脂肪酸均为饱和脂肪酸<sup>[13]</sup>。为了探索 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 的饱和脂肪酸是否参与了有机溶剂耐受机制,我们分别研究了 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 在甲苯胁迫生长实验和甲苯幸存实验中脂肪酸成分的变化,发现 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 是通过增加直链脂肪酸的含量,促使细胞膜变坚硬的方式抵御有机溶剂。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与培养基

*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 筛选自云南腾冲热泉<sup>[13]</sup>。液体培养基成分为 NaCl 3 g/L、蛋白胨 10 g/L 和酵母粉 5 g/L;再添加 1.5% 琼脂粉后为固体培养基。分析纯的甲苯、色谱纯的甲醇、正己烷和甲基叔丁基醚等试剂购自国药集团。

### 1.2 液体培养

为避免 55℃ 的高温培养过程中发生甲苯挥发,所有的培养均在 Balch 瓶中进行,瓶口以丁基橡胶瓶塞严格密封。采用针管取样。种子过夜培养,接入新鲜的培养基,调整控制起始  $OD_{600}$  为 0.2 左右。甲苯胁迫生长的样品组为直接添加 0.3% (V/V) 的甲苯。培养方式为静置培养,每个样品 3 个平行。

### 1.3 平板培养幸存实验

*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 在固体平板上的生长速度比液体培养时慢很多,24 h 以上才能观察到菌落。在平板培养的幸存实验中,过夜培养的种子,稀释一定倍数后涂布平板,55℃ 培养 36 h。此时的菌落直径约 1 mm。样品组倒入 100% 甲苯覆盖平板,厚度约 3 mm,放置 30 min。然后吸弃甲苯,收集细胞。细胞用去离子水洗涤 3 次,去除残留甲苯。

### 1.4 脂肪酸成分的抽提

培养好的菌体细胞离心收集 (8000 × g, 5 min),去离子水洗涤 3 次。脂肪酸的提取方法按照 Sherlock Microbial Identification System manual (version 4.0,

MIDI) 进行。大致过程为:菌体细胞加入 NaOH-甲醇试剂在 100℃ 进行皂化,然后加入盐酸-甲醇溶液在 80℃ 进行甲基化,接着加入正己烷-甲基叔丁基醚溶液进行萃取,最后用 NaOH 溶液洗涤。

### 1.5 气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析

脂肪酸的定量测定采用 GC-MS 系统 (Agilent 7890 GC/5975 MSD) 分析。分析条件为:起始温度为 150℃,以 5℃ /min 升至 270℃,然后升至 300℃,保持 2 min。氦气做载气,流速 1 mL/min。质谱库 (Wiley Registry 8th Edition/NIST 2005) 识别各种脂肪酸,以脂肪酸的峰面积进行相对定量计算。

## 2 结果和讨论

### 2.1 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 生长过程中脂肪酸的变化

为了严格比较甲苯胁迫的样品组和无甲苯的对照组的脂肪酸变化情况,我们首先检测了菌株 E13<sup>T</sup> 生长过程中脂肪酸的成分的变化。菌株 E13<sup>T</sup> 的 9 种饱和脂肪酸分别为 iso-C14:0、C14:0、iso-C15:0、anteiso-C15:0、C15:0、iso-C16:0、C16:0、iso-C17:0 和 C17:0<sup>[13]</sup>。在液体培养条件下,C16:0 的含量最高,达到约 40%,而剩余 8 种脂肪酸中最高的 iso-C15:0 含量不到 12%,因此,虽然不同的脂肪酸的含量变化规律不尽相同,但是 C16:0 的变化基本上决定了细胞膜的坚硬度。相同碳链长度下,直链脂肪酸的溶解度比支链脂肪酸高,也就更为坚硬。而细胞膜中直链脂肪酸含量高,则意味着膜较为坚硬<sup>[15]</sup>。因此,我们将菌株 E13<sup>T</sup> 的脂肪酸划分为直链脂肪酸 (C14:0、C15:0、C16:0 和 C17:0 含量之和) 和支链脂肪酸 (iso-C14:0、iso-C15:0、anteiso-C15:0、iso-C16:0 和 iso-C17:0 含量之和) 两类进行比较研究。

*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 未添加甲苯时的生长曲线如图 1 所示,相应生长点的脂肪酸成分如图 2-A 所示。由图 2-A 可见,菌株 E13<sup>T</sup> 中的脂肪酸成分会随着菌体的生长而变化,并不是固定不变的。接种时菌体中的直链脂肪酸之和为  $60.0 \pm 1.8\%$ ,支链脂肪酸之和为  $40.0 \pm 1.4\%$ 。随着菌体的生长,直链脂肪酸的含量先略微上升,然后持续下降;支链脂肪酸的含量也是先略微下降,然后持续增加。这个略有调整发生在 6 h,根据图 1 所示为菌株

从短暂的延滞期进入初始生长的时刻。然后随着菌体细胞开始生长,直链脂肪酸持续下降到  $41.8 \pm 2.6\%$ , 而支链脂肪酸持续上升到  $58.2 \pm 2.1\%$  的水平。达到最高细胞密度后,菌株 E13<sup>T</sup> 没有非常明显的平稳期,而是急速进入衰亡期。在衰亡期直链脂肪酸的含量还会进一步下降。脂肪酸的这种变化过程说明,在生长过程中,细胞膜的硬度仅在延滞期略微变硬,然后就持续变软。

添加了 0.3% (V/V) 甲苯后, *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 的生长曲线如图 1 所示,相应生长点时的脂肪酸成分如图 2-B 所示。由图 1 可见,甲苯的存在使菌株 E13<sup>T</sup> 出现了一个长达 22 h 延滞期,然后菌体细胞才开始生长。一旦开始生长,生长速度和对照组相差不大,都是维持十几个小时的对数生长期,然后急剧进入衰亡期。脂肪酸变化的整体趋势和对照组的整体趋势类似,都是直链脂肪酸的含量先小幅度上升,然后持续下降;支链脂肪酸的含量先小幅度下降,然后持续增加。

*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 在无添加和甲苯胁迫生长这两种情况下的脂肪酸变化都说明了:①菌株 E13<sup>T</sup> 的脂肪酸成分随菌体生长而发生动态变化;②随着菌体的生长,细胞膜的硬度仅在延滞期略微变硬,然后就持续变软。

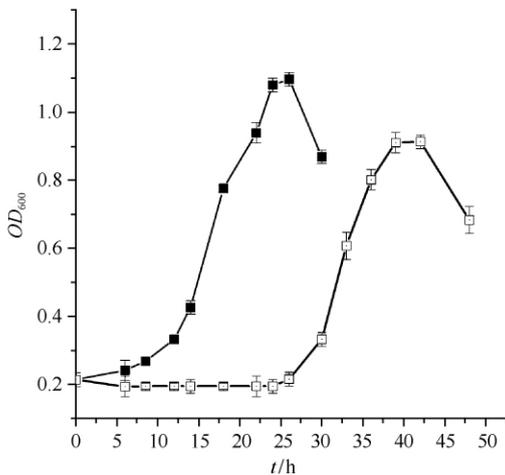


图 1. *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 在 55°C 在无添加 (■) 和添加 0.3% (V/V) 的甲苯 (□) 时的生长曲线

Figure 1. *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> cells grown at 55°C in the absence (■) and presence (□) of 0.3% (V/V) toluene.

## 2.2 甲苯对 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 生长时脂肪酸成分的影响

由于 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 的脂

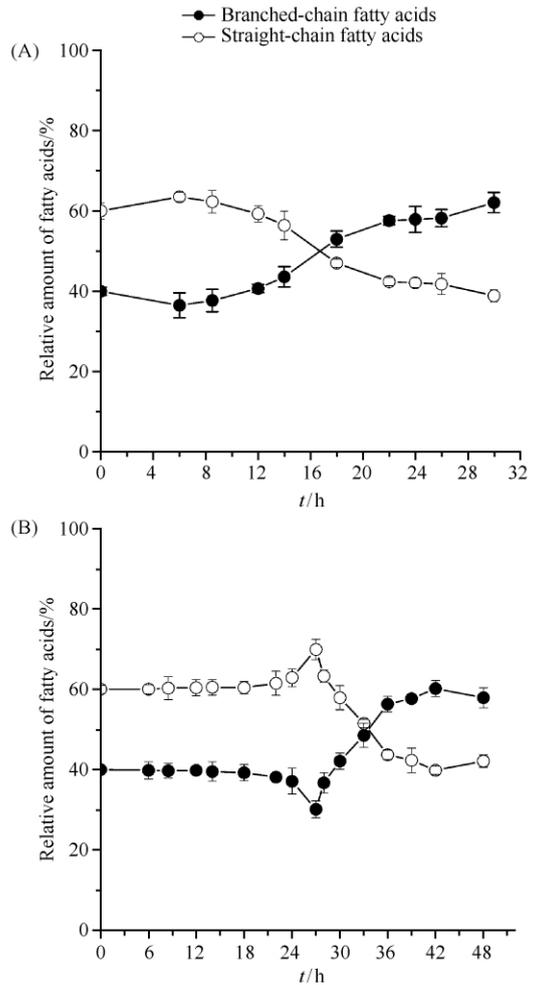


图 2. *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 在 55°C 在无添加 (A) 和添加 0.3% (V/V) 的甲苯 (B) 培养生长时的脂肪酸成分

Figure 2. Fatty acid composition of *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> for cultures grown at 55°C in the absence (A) and presence of 0.3% (V/V) toluene (B).

肪酸成分是动态变化的,因此我们分别选取初始生长期(甲苯胁迫的样品组培养 27 h 和对照组培养 6 h)、对数生长早期(样品组培养 28 h 和对照组培养 12 h)和对数生长后期(样品组培养 36 h 和对照组培养 22 h),比较分析甲苯胁迫对脂肪酸成分的影响(图 3)。甲苯胁迫下生长的菌株 E13<sup>T</sup> 无论在哪个生长时期,其细胞膜中的直链脂肪酸含量都比对照组样品的高,支链脂肪酸的含量比对照组样品的低。这说明,甲苯的存在促使菌株 E13<sup>T</sup> 调整细胞膜变硬;也就是说,菌株 E13<sup>T</sup> 需要更为坚硬的细胞膜才能在高温、强毒性的甲苯共同胁迫下生存。很多常温的耐受有机溶剂菌也是调节细胞膜变硬,以

抵御有机溶剂的毒性。但是与 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 不同的是,它们都是通过调节不饱和脂肪酸实现膜硬度的调节。例如,恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) S12 在甲苯胁迫下会增加饱和脂肪酸的含量、降低不饱和脂肪酸<sup>[10]</sup>;恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) CN-T19 在甲苯胁迫下饱和/不饱和脂肪酸的比例变化不明显,但是顺式/反式不饱和脂肪酸的比例却显著降低<sup>[9]</sup>。芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) ORAs2 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 在有机溶剂胁迫下,也是通过提高饱和脂肪酸的含量、降低不饱和脂肪酸含量抵御毒性<sup>[11,16]</sup>。因此,*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 作为目前唯一有机溶剂耐受的严格嗜热细菌,它的特点是通过增加饱和直链脂肪酸的含量增加细胞膜的坚硬度。

但是,这种细胞膜变坚硬的需求与菌体细胞自身生长过程中细胞膜会变软的生长需求是相反的。因此,我们可以看到随着菌体的生长,甲苯胁迫的样

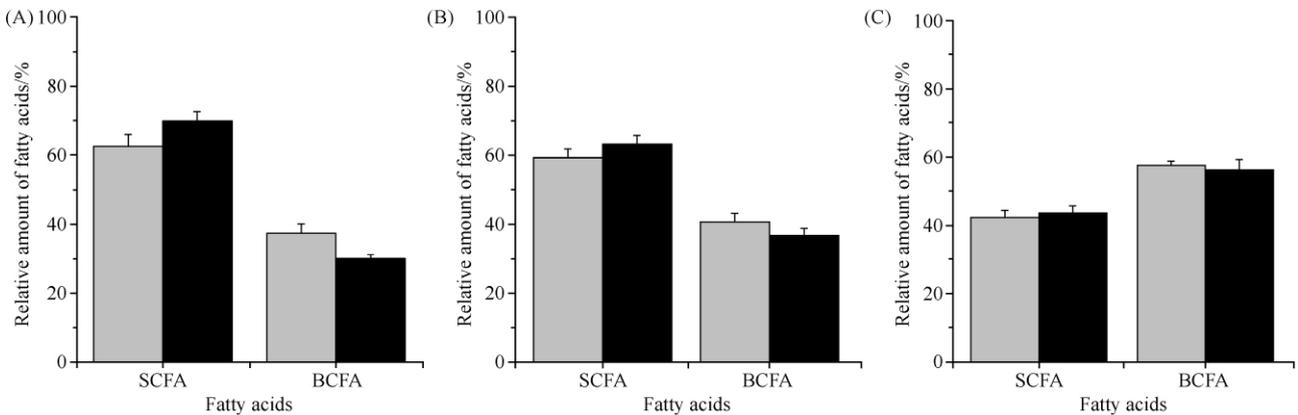


图 3. 甲苯对 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 的脂肪酸成分的影响

Figure 3. Effect of toluene on the fatty acid contents of *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup>. A: Initial growth phase; B: Early exponential growth phase; C: Late exponential growth phase. SCFA: Straight-chain fatty acids; BCFA: Branched-chain fatty acids. Gray: Control sample without toluene; black: sample with toluene.

### 2.3 甲苯幸存实验中菌株 E13<sup>T</sup> 脂肪酸的变化

有机溶剂幸存实验是测试在 100% 有机溶剂覆盖时菌体细胞虽然不生长,但是能抵御有机溶剂不发生死亡的能力。在有机溶剂耐受菌中,幸存能力和生长能力是两种不同的生理特性<sup>[5,12]</sup>。与已知的常温有机溶剂耐受菌比较,*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 在有机溶剂中生长的能力并不突出,但是在有机溶剂中幸存的能力却非常强<sup>[14]</sup>,仅比描述为最耐受有机溶剂的革兰氏阳性菌 *Staphylococcus haemolyticus* 略差<sup>[12]</sup>。这意味着 *A. flavithermus* ssp.

*yunnanensis* 在细胞不生长时能够对细胞进行某种调节,以抵御外界强毒性的有机溶剂。我们对菌株 E13<sup>T</sup> 在甲苯胁迫下生长时脂肪酸成分的上述分析结果表明,菌株 E13<sup>T</sup> 一旦开始生长,其脂肪酸的调节能力并不强,从延滞期进入初始生长期的脂肪酸调整才是菌株 E13<sup>T</sup> 耐受甲苯的关键所在。这个结论提示我们,*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 极强的幸存的能力有可能是因为 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 能够在幸存实验中对脂肪酸成分有一个类似的成功调整。为了验证这个推测,菌株 E13<sup>T</sup> 在

品组和对照组的脂肪酸含量差别越来越小,到对数生长后期时(图 3-C)时,两者的差别已经非常小。或许正是由于脂肪酸调节策略中,抵御有机溶剂的需求与菌体生长需求是矛盾的,因此自然界中罕见这样的嗜热有机溶剂耐受菌,而且这种菌株也无法像耐受有机溶剂的常温菌一样耐受极高浓度的有机溶剂<sup>[17]</sup>。

值得注意的是,甲苯胁迫促使 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 需要通过一个漫长的脂肪酸的成分不变的延滞期才能生长。脂肪酸成分从 22 h 开始变化,24-27 h 内急剧变化,与此同时,菌株也开始生长。这暗示了,菌体细胞在延滞期内一直在试图调节脂肪酸成分,当成功的积累了更多的直链脂肪酸(样品组的直链脂肪酸含量比对照组高 6.4%,图 3-A)后,细胞就能抵御甲苯的毒性,顺利的开始生长。因此,从延滞期进入初始生长时刻的脂肪酸成分调整是菌株 E13<sup>T</sup> 耐受甲苯的关键点。

*yunnanensis* 在细胞不生长时能够对细胞进行某种调节,以抵御外界强毒性的有机溶剂。我们对菌株 E13<sup>T</sup> 在甲苯胁迫下生长时脂肪酸成分的上述分析结果表明,菌株 E13<sup>T</sup> 一旦开始生长,其脂肪酸的调节能力并不强,从延滞期进入初始生长期的脂肪酸调整才是菌株 E13<sup>T</sup> 耐受甲苯的关键所在。这个结论提示我们,*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 极强的幸存的能力有可能是因为 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 能够在幸存实验中对脂肪酸成分有一个类似的成功调整。为了验证这个推测,菌株 E13<sup>T</sup> 在

甲苯幸存实验中的脂肪酸如图 4 所示。在平板上生长 36 h 的菌体细胞中直链脂肪酸含量为  $45.6 \pm 2.1\%$ , 支链脂肪酸含量为  $54.4 \pm 3.3\%$ 。100% 甲苯覆盖 30 min 后, 直链脂肪酸含量显著增长 7.2%, 达到  $52.8 \pm 1.9\%$ , 支链脂肪酸含量则降低为  $47.2 \pm 1.3\%$ 。这个调整幅度比菌株 E13<sup>T</sup> 从延滞期进入初始生长期时的脂肪酸调整幅度更大, 说明细胞膜的坚硬度更高。由此可见, *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 能在 100% 甲苯中幸存, 正是因为脂肪酸成分的调节使得细胞膜变得更坚硬。

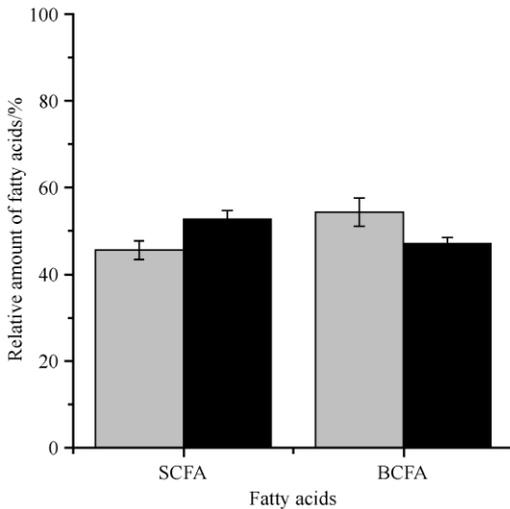


图 4. 100% 甲苯幸存实验中 *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> 的脂肪酸成分

Figure 4. The fatty acid contents of *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> to survive 100% toluene. SCFA: Straight-chain fatty acids; BCFA: Branched-chain fatty acids. Gray: Control sample without toluene; Black: Sample with toluene.

### 3 结论

*A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 是目前唯一的有机溶剂耐受的严格嗜热细菌。它通过增加饱和和直链脂肪酸的含量促使细胞膜变得更为坚硬, 进而抵御有机溶剂的毒性。在 100% 有机溶剂幸存实验中, *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* 直链脂肪酸的增加幅度最为显著。有机溶剂胁迫的生长实验中, 调节直链脂肪酸增加的关键点仅发生在从延滞期进入初始生长的时刻。菌株生长后, 细胞膜变坚硬的需求与菌体自身生长中细胞膜变软的生长需求相反, 直链脂肪酸的含量持续下降。

### 参考文献

- [1] Aono R, Inoue A. *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. ed. New York: Wiley-Liss, 1998: 287-310.
- [2] Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S, Meinhardt F. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74 (5): 961-973.
- [3] Tang X, Sun H, He B. Organic solvent tolerant bacteria and enzymes for application in biocatalysis. *Progress in Chemistry*, 2009, 21 (12): 2726-2733. (in Chinese)  
唐啸宇, 孙洪林, 何冰芳. 耐有机溶剂微生物及酶类在生物催化中的应用. *化学进展*, 2009, 21 (12): 2726-2733.
- [4] Wang X, Wang S, Li W, Li Y, Zhang Y. Tolerant mechanisms of bacteria to organic solvents. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25 (5): 641-649. (in Chinese)  
王鑫昕, 王少华, 李维, 李寅, 张延平. 细菌的有机溶剂耐受机制. *生物工程学报*, 2009, 25 (5): 641-649.
- [5] Sardesai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents. *Research in Microbiology*, 2002, 153 (5): 263-268.
- [6] Knobloch JKM, Bartscht K, Sabottke A, Rohde H, Feucht HH, Mack D. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (8): 2624-2633.
- [7] Gupta A, Singh R, Khare SK, Gupta MN. A solvent tolerant isolate of *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, 2006, 97 (1): 99-103.
- [8] Heipieper HJ, Diefenbach R, Keweloh H. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (6): 1847-1852.
- [9] Kim IS, Shim JH, Suh YT. Changes in membrane fluidity and fatty acid composition of *Pseudomonas putida* CN-T19 in response to toluene. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66 (9): 1945-1950.
- [10] Heipieper HJ, de Bont JAM. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60 (12): 4440-4444.
- [11] Pepi M, Heipieper HJ, Fischer J, Ruta M, Volterrani M,

- Focardi SE. Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. *Extremophiles*, 2008, 12 (3) : 343-349.
- [12] Nielsen LE, Kadavy DR, Rajagopal S, Drijber R, Nickerson KW. Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (9) : 5171-5176.
- [13] Dai J, Liu Y, Lei Y, Gao Y, Han F, Xiao YZ, Peng H. A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 320 (1) : 72-78.
- [14] Gao Y, Dai J, Peng H, Liu Y, Xu T. Isolation and characterization of a novel organic solvent-tolerant *Anoxybacillus* sp. PGDY12, a thermophilic gram-positive bacterium. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110 (2) : 472-478.
- [15] Kaneda T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriological Reviews*, 1977, 41 (2) : 391-418.
- [16] Sinensky M. Homeoviscous adaptation, a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1974, 71 (2) : 522-525.
- [17] Inoue A, Horikoshi K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 1989, 338 (6212) : 264-266.

## Adaptation of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> to toluene at the level of fatty acid composition of membrane

Yunyun Zheng, Maojiao Chen, Min Wang, Hui Peng\*

School of Life Sciences, Anhui University, Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230039, Anhui Province, China

**Abstract:** [Objective] *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* is now the only species of thermophilic bacteria able to tolerate toxic solvents at high temperature. The adaptive responses of *A. flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> to toluene on the level of fatty acid composition of membrane were studied in detail. [Methods] The extraction of fatty acids was performed according to the method described in the Sherlock Microbial Identification System manual. The fatty acid compositions were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). [Results] In presence of 0.3% (V/V) toluene, key moment to adapt the saturated straight-chain fatty acids was that when cells grew from the lag phase to the initial growth phase in liquid. The saturated straight-chain fatty acids were continuously decreased as the strain E13<sup>T</sup> to grow. In survival of the cells in 100% toluene, the saturated straight-chain fatty acids increased significantly. [Conclusion] *A. flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup> alters its membrane fluidity via fatty acid composition to become more rigid when it is exposed to solvent, which is consistent that commonly found in mesophilic organic solvent-tolerant bacteria. However, it adapted its membrane by increasing straight-chain saturated fatty acids, rather than unsaturated fatty acids, which was demonstrated in mesophilic organic solvent-tolerant bacteria.

**Keywords:** *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* E13<sup>T</sup>, organic solvent-tolerant bacterium, straight-chain fatty acids, branched-chain fatty acids, toluene

(本文责编:王晋芳)