

1株烟碱降解菌的筛选、 鉴定及其降解性能的初步研究

孔雯 先锋 李长影 王家昕 李晓华

中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074

摘要 以烟碱为唯一碳源,从湖北省襄樊烟草种植地中分离得到1株烟碱降解菌,命名为DBA5。经常规的形态观察、生理生化分析和16S rDNA序列同源性分析,初步鉴定该菌株为烟碱节杆菌属(*Arthrobacter nicotianae*)。当烟碱质量浓度为4.0 g/L时,培养48 h烟碱降解率为93.32%,生长旺盛。当烟碱质量浓度为5.0 g/L时,培养48 h烟碱降解率为65.10%。当烟碱质量浓度高于6.0 g/L时,DBA5菌株生长和烟碱降解均呈下降趋势,烟碱降解率低于7.56%。

关键词 烟碱; 生物降解; 16S rDNA; 烟碱节杆菌

中图分类号 Q 939 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0030-04

烟碱是烟草生物碱的主要成分,占烟草生物碱的95%以上,是影响烟叶品质的重要因素之一。长期吸烟会导致对烟碱的依赖性,而过量吸入烟碱则会抑制中枢神经、麻痹心脏,甚至有致命的危险。在吸烟过程中烟碱还会被亚硝化,生成烟叶中特有的强烈致癌剂N-亚硝胺,烟碱含量过高会增加烟气的刺激性,影响卷烟烟味,安全性差,在我国烤烟主产区所产烟叶尤其是上部烟叶烟碱含量偏高,达到3%~4%,白肋烟烟碱含量甚至高达6%^[1]。

国内卷烟企业目前贮存的烤烟上部叶较多,因烟碱含量较高而难以较多用于生产,这个问题已引起有关方面的重视^[2-3]。如何降低烟叶中的烟碱含量是各卷烟企业所面临的现实问题,目前国内研究较多的是用过滤嘴过滤、打孔稀释及使用烟草薄片等物理措施来降低烟碱含量,但是这些方法会造成烟、香、气的损失。用微生物发酵降解烟叶中的烟碱含量,是一种既可降低烟碱含量又能改进卷烟品质的理想方法,国外烟叶企业很早就已开始利用微生物对烟叶中的烟碱进行降解,并以此来满足一部分消费群体对低烟碱卷烟的需求^[4]。本研究试图从长期种植烟草的土壤中分离烟碱降解菌,并对其降解性能进行研究,旨在为降低烟叶和烟厂废弃物中烟

碱含量提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品采自湖北省襄樊市烟草种植基地, Nicotine(纯度 $\geq 98\%$)购自洛阳天科生物工程有限公司。

烟碱培养基:13.3 g K_2HPO_4 , 4.0 g KH_2PO_4 , 0.1 g $(NH_4)_2SO_4$, 1.0 g 酵母粉, 10.0 mL 微量元素(1.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 用0.1 mol/L HCl溶解到100 mL),加蒸馏水到1 000 mL,自然pH。培养基121℃高压蒸汽灭菌20 min后,加入一定量烟碱(用0.22 μm 滤膜过滤)。

烟碱分离培养基:烟碱培养基总添加2.0%琼脂。

种子培养基:10.0 g 胰化蛋白胨, 5.0 g 酵母提取物, 10.0 g NaCl, 先溶于900 mL去离子水,用5 mol/L的NaOH调pH值至7.0,用去离子水定容至1 000 mL。

1.2 烟碱降解菌的筛选

取土壤样品2.0 g于20 mL烟碱培养基,

收稿日期:2010-06-28

基金项目:国家自然科学基金项目(3107008)、湖北省自然科学基金项目(2008CDB076)和中南民族大学大学生科研创新基金项目(YZCX100303Z)

孔雯,硕士研究生,研究方向:分子微生物学。E-mail: kongwen1985@163.com

通讯作者:李晓华,博士,教授,研究方向:微生物与基因工程。E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

30℃、180 r/min 摇床培养。用 0.9% 生理盐水梯度稀释,涂布于烟碱分离培养基,于 30℃ 培养,挑取菌株划线分离纯化。分别将分离纯化的菌株接入烟碱培养基中,于 30℃、180 r/min 摇床培养,测定发酵液中烟碱含量。

1.3 发酵液中烟碱含量的测定

将分离纯化的菌株接入烟碱培养基中(烟碱质量浓度为 4.0 g/L),于 30℃、180 r/min 摇床培养,用不接菌的烟碱培养基作空白对照。发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.05 mol/L HCl 溶液稀释到合适的 $D(\lambda)$ 范围。以 0.05 mol/L HCl 溶液作参比,测定发酵液在 259 nm 处的吸光值,烟碱降解率计算公式为:

烟碱降解率 = (原培养液中烟碱含量 - 发酵液中烟碱含量) / 原培养液中烟碱含量 × 100%。

1.4 菌种鉴定

1) 形态结构观察及生理生化特性鉴定。参照文献[5]进行。

2) 16S rDNA 序列的测定。细菌总 DNA 参照文献[6]的方法。用于 16S rDNA 的 PCR 反应的引物为 1 对通用引物(由北京三博远志生物技术有限公司合成),正向引物 F1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物 F2: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'。PCR 反应体系(20 μL): 10×PCR 缓冲液 2 μL, dNTP 1 μL, 正向引物 F1 和反向引物 F2 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, Taq 酶 0.25 μL, 超纯水 13.75 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物的纯化和测序由北京三博远志生物技术有限公司完成。测序结果利用 Blast 在 GenBank 基因库中进行同源比较并鉴定。

1.5 菌体生长量的测定

菌株以 5% 的接种量接种至烟碱培养基中,在 30℃、180 r/min 条件下摇床培养,定时取样测定菌体的生长量和烟碱降解率,采用分光光度法,以 $D_{600\text{ nm}}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 烟碱的紫外吸收

用 0.05 mol/L 的 HCl 溶液,把纯烟碱配成质量浓度为 5.0 g/L 的工作液,分别取工作液 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mL,以 0.05 mol/L

HCl 溶液定容至 10 mL,以 0.05 mol/L HCl 溶液为参比,测定烟碱不同质量浓度下 259 nm 处的光密度值,结果显示:烟碱质量浓度为 0.005~0.030 g/L 时,吸光值(Y)与烟碱浓度(X)呈正相关,回归方程为 $Y=35.429X+0.0053$, R^2 为 0.9993。

2.2 烟碱降解菌的分离

经分离纯化,筛选得到多株降解烟碱的菌株,将分离得到的菌株摇瓶培养 48 h 后进行降解烟碱能力的测定,其中,DBA5 菌株烟碱降解结果(图 1)显示:烟碱培养基(CK)在 259 nm 处有吸收峰,而经 DBA5 菌株摇瓶培养 48 h 后 259 nm 处吸收峰消失,表明 DBA5 菌株具有降解烟碱的能力。

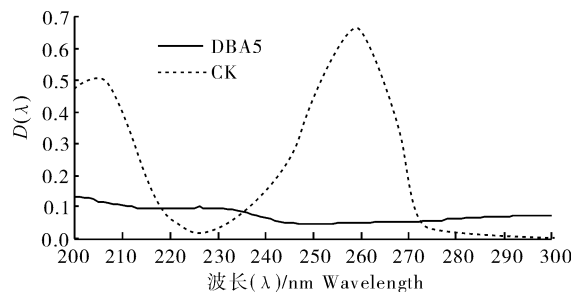


图 1 DBA5 菌株发酵液和烟碱培养基紫外吸收图谱
Fig.1 The ultraviolet absorption pattern of DBA5 strain fermentation liquid and nicotine medium

2.3 菌株 DBA5 的鉴定

经显微观察和生理生化试验结果表明:DBA5 菌株革兰氏染色阳性,在平板培养基上菌落呈紫色、圆形、表面内凹、中间突起、边缘整齐;在液体烟碱培养基中,发酵液颜色呈棕褐色。伏-普试验、甲基红试验、吲哚试验和硫化氢试验均呈阴性,柠檬酸盐试验呈阳性。

DBA5 菌株的 16S rDNA 序列长度为 1 177 bp,在 GenBank 中的登录号为 HM543725。序列同源性分析表明,DBA5 菌株与烟碱节杆菌属(*Arthrobacter nicotianae*)3 个菌株同源性均在 96% 以上,从 DBA5 的系统发育树进化树(图 2)可以看出:DBA5 菌株与烟碱节杆菌(*A. nicotianae*)分支较近(bootstrap 值大于 70%)。结合生理生化特性,初步确定 DBA5 菌株为烟碱节杆菌属(*Anicotianae*)。

2.4 DBA5 菌株降解烟碱的特性

1) DBA5 菌株烟碱降解率与生长量的关系。结果显示(图 3):随着 DBA5 菌株的生长,烟碱不断被降解,36 h DBA5 菌株生长量达到最大,此时烟碱的降解率达 91.23%,表明烟碱降解率和菌体生长量呈正相关。

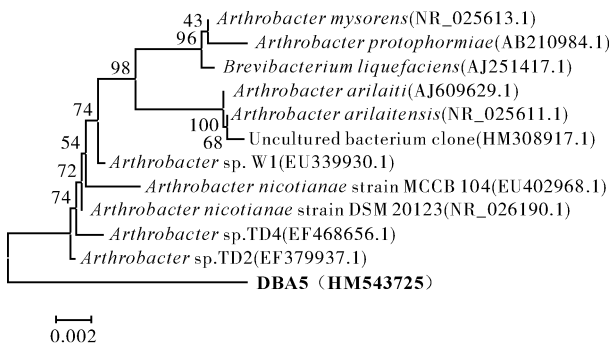


图 2 基于 16S rDNA 基因序列的 DBA5 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain DBA5 based on 16S rDNA

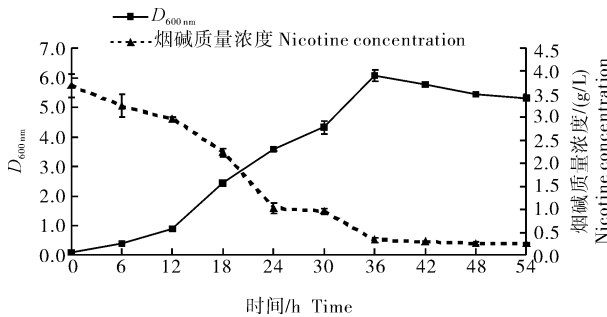


图 3 DBA5 菌株的生长与烟碱降解

Fig. 3 The growth and degradation curve of strain DBA5

2) DBA5 菌株对烟碱的耐受性。DBA5 菌株以 5% 的接种量接种至不同烟碱含量的烟碱培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养, 48 h 取样测定菌株生长量和烟碱降解率, 结果(表 1)显示: 当培养基中烟碱质量浓度为 4.0 g/L 时, 烟碱降解率为 93.32%, 生长旺盛。当培养基中烟碱质量浓度达到 5.0 g/L 时, 烟碱降解率为 65.10%, 生长受到一定程度抑制。当培养基中烟碱浓度高于 6.0 g/L 时, DBA5 菌株生长和烟碱降解均呈下降趋势, 烟碱降解率低于 7.56%。

表 1 不同质量浓度烟碱对 DBA5 菌株烟碱降解率和生长量的影响

Table 1 Effect of nicotine concentration on growth and degradation of strain DBA5

烟碱质量浓度/(g/L) Nicotine concentration	$D_{600\text{ nm}}$	烟碱降解率/% Nicotine degradation rate
4.0	4.000	93.32
5.0	3.010	65.10
6.0	1.093	7.56
7.0	0.881	7.53
8.0	0.345	5.03

3 讨论

本研究从湖北省襄樊烟草种植地中分离得到 1

株烟碱降解菌。经常规的形态观察、生理生化分析和 16S rDNA 序列同源性分析, 初步鉴定该菌株为烟碱节杆菌属 (*Arthrobacter nicotianae*)。当烟碱质量浓度为 4.0 g/L 时, 培养 48 h 烟碱降解率为 93.32%, 生长旺盛。当烟碱质量浓度为 5.0 g/L 时, 培养 48 h 烟碱降解率为 65.10%。当烟碱质量浓度高于 6.0 g/L 时, DBA5 菌株生长和烟碱降解均呈下降趋势, 烟碱降解率低于 7.56%。

烟碱是烟草类植物体内主要的天然生物碱, 烟碱的毒性很高, 被列为恶性环境污染物质之一, 目前国内外报道的降解烟碱微生物主要有: 争论产碱菌 (*Alcaligenes paradoxus*)、球形节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*)、烟草节杆菌 (*Arthrobacter nicotianae*)^[4]、噬烟碱节杆菌 (*Arthrobacter nicotinovorans*)^[5]、氧化节杆菌 (*Arthrobacter oxydans*)、纤维单胞菌 (*Cellulomonas* sp.)、棒杆菌属 (*Corynebacterium* sp.)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、烟草微球菌 (*Micrococcus nicotianae*)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.)^[6-7]、恶臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*)^[8]、中间苍白杆菌属 (*Ochrobactrum intermedium*)^[9] 等。Wada 等^[13] 利用假单胞菌来降解烟碱, 约有 35% 的烟碱未发生降解; 马林等^[14] 利用筛选的节杆菌降解烟碱, 发现培养 78 h 后烟碱降解 80%。本研究中筛选的菌株 DBA5 在烟碱浓度为 4 g/L 的培养基中培养 48 h, 烟碱降解率达 93.32%, 表明该菌具有较高的烟碱降解率。

参 考 文 献

- [1] 张彦东, 罗昌荣, 王辉龙, 等. 微生物降解烟碱研究应用进展[J]. 烟草科技, 2003(2): 3-7.
- [2] 赵铭钦, 陈秋会, 陈红华. 中外烤烟烟叶中挥发性香气物质的对比[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 875-879.
- [3] 张学伟, 张玺, 余金恒, 等. 植物生长物质对烤烟上部叶香味品质的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 660-663.
- [4] 李梅云. 烟碱的微生物降解研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(3): 94-97.
- [5] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 111-120.
- [6] KIESER T, BIBB M J, CHATER K F, et al. Practical streptomyces genetics: a laboratory manual[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [7] 夏振远, 雷丽萍, 吴玉萍, 等. 降烟碱细菌——烟草节杆菌 K9 的分离及鉴定[J]. 中国烟草科学, 2006(2): 1-4.

- [8] DANIEL B, CRISTINEL S, RODERICH B, et al. Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2, 6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183: 5262-5267.
- [9] 万虎, 赵海刚, 宋纪真, 等. 高浓度烟碱降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J]. 烟草科技, 2009(4): 50-53.
- [10] AI D R, HANG M, XIAO H P, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine[J]. Research in Microbiology, 2005, 156: 700-706.
- [11] SHU N, WANG Z L, HONG Z T, et al. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16[J]. Microbiology, 2007, 153: 1556-1565.
- [12] 袁勇军, 陆兆新, 黄丽金, 等. 烟碱降解细菌的分离、鉴定及其降解性能的初步研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 181-182.
- [13] WADA E, YAMASAKI K. Mechanism of microbial degradation of nicotine[J]. Science, 1953, 117: 152-153.
- [14] 马林, 武怡, 曾晓鹰, 等. 降烟碱微生物的筛选及其酶在烟草中的应用[J]. 烟草科技, 2005(9): 6-8.

Isolation and characterization of a high nicotine-degradation bacterium

KONG Wen XIAN Feng LI Chang-ying WANG Jia-xin LI Xiao-hua

Key Lab for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission/College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract Thirty bacterial strains were isolated from soil using nicotine as the only carbon source and a high nicotine degradation bacterium strain, named as DBA5, was screened out from them. Based on standard morphological, physiological properties and 16S rDNA analysis, DBA5 was identified as *Arthrobacter nicotianae*. When the medium with 4.0 g/L nicotine, DBA5 could grow well and degrade 93.32% of nicotine in 48 h. When the medium with 5.0 g/L nicotine, it degraded 65.10% of nicotine in 48 h. The growth and nicotine degradation of DBA5 was declined when nicotine concentration was more than 6.0 g/L, and it degraded less than 7.56% of nicotine. DBA5 showed high ability to degrade nicotine.

Key words nicotine; biodegradation; 16S rDNA; *Arthrobacter nicotianae*

(责任编辑: 张志钰)