

尼古丁降解菌的分离筛选及初步鉴定

韩绍印¹, 李永宽², 席宇¹, 杨艳坤¹, 宋淑红¹, 朱大恒^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450052; 2. 郑州卷烟总厂, 河南 郑州 450000)

摘要: 分别采用基础平板培养法和富集培养法, 从河南烟叶表面分离筛选尼古丁降解菌。结果表明: 采用基础平板培养法分离出来的 30 个菌株中, 有效菌株仅占所分离菌株的 60.0%, 对尼古丁降解效率大于 30% 的仅有 6 株菌(37 °C, 24h)。而富集培养法分离出来的 30 个菌株中, 有效菌株占所分离菌株的比例达 93.3%, 对尼古丁降解效率大于 30% 的有 14 株菌, 表明富集培养法是一种快速高效分离筛选尼古丁降解菌的理想方法。经初步鉴定, 分离到的 2 株具有较高活性的尼古丁降解菌分别为短芽孢杆菌(*B. brevis*)和侧孢芽孢杆菌(*B. laterosporus*)。

关键词: 微生物; 烟草; 尼古丁降解; 分离; 鉴定

中图分类号: S154.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)09-0048-04

Isolation and Identification of Nicotine-degrading Microbes

HAN Shao-yin¹, LI Yong-kuan², XI Yu¹,

YANG Yan-kun¹, SONG Shu-hong¹, ZHU Da-heng^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. Zhengzhou Cigarette Factory, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Nicotine-degrading microbes were Isolated from Henan tobacco leaves by basic culture and enrichment culture methods. The results showed that the effect of enrichment culture is better than that of basic culture in isolation and selection of nicotine degrading microbes. The ratio of valid strains isolated by basic culture method was 60.0%, while that by enrichment culture method was 93.3%. The stain number with nicotine degradation rate of more than 30% was 6 out of the 30 strains isolated from the basic culture, and 14 from the enrichment culture. Based on the physiology and biochemistry characters, 2 strains with higher nicotine-degrading activity were identified, i. e. *B. brevis* and *B. laterosporus*.

Key words: Microbe; Tobacco; Nicotine; Degradation; Isolation; Identification

烟草的叶片、土壤和陈化叶片中存在许多能够有效降解尼古丁(nicotine)的微生物, 在烟叶生长、调制、陈化、加工和储存过程中都能对烟叶的品质产生很大的影响。利用微生物降解尼古丁, 在提高烟叶品质、降低烟草危害、保护环境和提高烟草资源利用率方面具有重要意义和发展应用前景, 是目前烟

草研究的一个热点。国外在利用微生物降解尼古丁方面已开展了大量的基础研究和应用研究工作^[1~7], 国内研究尚处于起步阶段^[8~10]。可降解尼古丁的微生物种类繁多, 微生物代谢尼古丁也有多种复杂的途径和分子机理, 随着研究的不断深入, 新的可降解尼古丁微生物的开发以及微生物代谢尼古

收稿日期: 2007-05-11

基金项目: 河南省自然科学基金项目(511030400); 河南省重点科技攻关项目(072102170010)

作者简介: 韩绍印(1963-), 男, 河南驻马店人, 实验师, 主要从事环境微生物学研究。

通讯作者: 朱大恒(1965-), 男, 河南郑州人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事微生物工程、微生物降解与转化、烟草微生物发酵研究。

丁的分子生物学研究将是今后该领域研究的趋势。开发丰富的可降解尼古丁的微生物资源,加强尼古丁代谢的相关新酶及功能基因的研究,将为进一步利用尼古丁降解酶及功能基因和工程菌的构建提供新的理论基础和实验材料。有关尼古丁降解菌分离筛选方法的比较研究国内未见专文报道,本研究初步采用基础平板培养法和富集培养法2种方法,比较了不同分离方法筛选尼古丁降解菌的效果,并对分离到的2株具有较高活性的尼古丁降解菌进行了初步鉴定,旨在探索简便、快速高效分离筛选尼古丁降解菌的微生物学实验方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌源烟样 河南 C₃F 陈化 2 年的烟叶。

1.1.2 培养基的制备 基础培养基:牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 17.0 g, pH 7.0, 加水至 1000 mL 溶解,分装在三角瓶或试管中,放入高压灭菌锅中于 121 °C 灭菌 20 min。液体培养基不加琼脂。

富集培养基: K₂HPO₄ · 3H₂O 13.3 g, KH₂PO₄ 4 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, 琼脂 15 g, 加入自行配制的微量元素溶液 0.5 mL 和尼古丁适量,加蒸馏水至 1000 mL, pH 7.0。放入高压灭菌锅中于 121 °C 灭菌 20 min。

尼古丁液体培养基: K₂HPO₄ · 3H₂O 13.3 g, KH₂PO₄ 4 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, 加入自行配制的微量元素溶液 0.5 mL 和尼古丁适量,加蒸馏水至 1000 mL, pH 7.0。放入高压灭菌锅中于 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离及纯化 称取适度破碎的烟叶样品 1 g, 浸入装有 100 mL 无菌水的三角瓶内, 摇匀, 振荡 15 min, 作为菌源样品。以菌源样品制备梯度稀释菌液, 采用涂布平板法分别以基础培养基和富集培养基分离菌株, 将涂布好的培养基放入恒温培养箱中于 37 °C 培养 48 h, 挑取单个菌落进行纯培养后接于斜面试管备用, 获得 J 组菌株共 30 株(基础培养基)和 F 组菌株共 30 株(富集培养基)。

1.2.2 尼古丁降解试验 分别将 J 组菌株和 F 组菌株接入装有 5 mL 尼古丁液体培养基的试管中, 摇床震荡培养 16 h, 制备菌液。分别将制备的 J 组菌株和 F 组菌株菌液加入装有 50 mL 尼古丁液体培养基的三角瓶中, 于 37 °C, 200 r/min 的摇床振荡

培养 48 h, 以尼古丁液体培养基 50 mL 加蒸馏水 5 mL 作空白对照, 检测各处理降解液中的尼古丁含量, 判定菌株分解尼古丁的能力。

1.2.3 尼古丁含量的测定 采用紫外分光光度法测定尼古丁含量, 降解液经 12000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.4% 的 HCl 稀释到合适的紫外吸光范围, 并以 0.4% 的 HCl 为参比液, 分别在 236 nm, 259 nm 和 282 nm 处测样品吸光值, 用 $A' = [A_{259} - 1/2(A_{236} + A_{282})]$ 表示尼古丁的相对含量。

1.2.4 菌株的鉴定 采用常规形态学观察方法对菌株菌落群体形态、个体形态特征进行观察描述; 采用 VITEK-32 全自动微生物分析仪检测微生物的生理生化特征。根据菌株的生理生化特征, 结合个体形态和群体形态特征, 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)对菌株进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同分离筛选方法筛选尼古丁降解菌的效果比较

不同分离筛选方法筛选出的各菌株对尼古丁的降解作用见表 1。由表 1 可以看出, 采用基础平板培养法和富集培养法均分离得到了部分对尼古丁有一定的降解作用的菌株。采用基础平板培养法获得的菌株中, 对尼古丁有降解作用的菌株为 18 株, 占所分离菌株的 60.0%, 对尼古丁降解效率大于 30% 的 (A' 低于 0.393) 仅有 6 株菌, 对尼古丁降解效率大于 40% 的 (A' 低于 0.337) 仅有 7 号、10 号、30 号共 3 株菌。而采用富集培养法分离出来的 30 个菌株中有 28 株可降解尼古丁, 有效菌株的比例达 93.3%, 其中对尼古丁降解效率大于 30% 的有 14 株菌, 对尼古丁降解效率大于 40% 的有 3 号、7 号、13 号、18 号、19 号、27 号、30 号, 共 7 株。可见, 富集培养法筛选尼古丁降解菌的效率明显优于基础平板培养法, 可使尼古丁降解菌的筛出率提高 60% 以上, 高活性尼古丁降解菌(降解效率大于 40%)的筛出率提高 1.33 倍。

微生物具有极强的和多种的生物催化活性, 利用富集培养法有利于找到降解某种化合物的微生物, 在农残等有害物质生物降解中被广泛采用, 本试验证明, 富集培养法也是一种快速高效筛选尼古丁降解菌的理想方法。

2.2 尼古丁降解菌的初步鉴定

对具有较高活性的 2 株尼古丁降解菌 J-30 和 F-27 的群体形态、个体形态特征进行了观察, 并对

表 1 不同分离筛选方法筛选出的各菌株对尼古丁的降解作用

编号	基础平板培养法(A')	富集培养法(A')
ck	0.562	0.562
1	0.747	0.570
2	0.723	0.425
3	0.542	0.337
4	0.603	0.379
5	0.657	0.477
6	0.708	0.503
7	0.263	0.257
8	0.616	0.407
9	0.381	0.367
10	0.337	0.339
11	0.648	0.406
12	0.397	0.417
13	0.534	0.307
14	0.750	0.463
15	0.452	0.567
16	0.531	0.367
17	0.349	0.462
18	0.529	0.329
19	0.456	0.330
20	0.380	0.436
21	0.670	0.381
22	0.488	0.550
23	0.482	0.372
24	0.522	0.359
25	0.464	0.507
26	0.616	0.504
27	0.467	0.234
28	0.618	0.509
29	0.740	0.510
30	0.221	0.273

生理生化特征进行了分析,结果列于表 2、表 3、表 4。2 株菌在琼脂平板上的菌落特征均为不规则型,边缘整齐,不透明,F-27 株为黄灰色,J-30 株为乳白色;2 株菌在液体中无菌膜,F-27 菌株不浑浊、有沉淀,J-30 菌株浑浊,无沉淀。

对个体形态特征观察结果表明,2 株菌均为杆菌,革兰氏反应均为阳性,长分别为 $3 \sim 5 \mu\text{m}$, $2 \sim 5 \mu\text{m}$,宽分别为 $0.7 \sim 0.9 \mu\text{m}$, $0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$,有芽孢,中生或近中生,F-27 菌株孢囊不膨大,J-30 菌株孢囊膨大,初步判定为芽孢杆菌。

生理生化特征分析结果表明,2 株菌的共同点表现为蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、丙酮酸、过氧化氢酶、硝酸盐还原反应均为阳性,木糖、精氨酸、淀粉、尿素、乳糖、棉子糖、P.V 反应均为阴性。但 F-27 菌株的半纤维素酶、甘露醇、纤维二糖、阿拉伯糖反应为阳性,在 pH 5.7 营养肉汤中可以生长,J-30 菌株的半纤维素酶、甘露醇、纤维二糖、阿拉伯糖反

应为阴性,在 pH 5.7 营养肉汤中不生长。

根据以上 2 株尼古丁降解菌的生理生化特征,结合个体形态、群体形态特征分析结果,F-27 菌株初步鉴定为短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*),J-30 菌株初步鉴定为侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)。

表 2 尼古丁降解菌的群体形态特征

培养方式	特征	F-27	J-30
平板培养	形状	不规则型	不规则型
	边缘	整齐	整齐
	光学特性	不透明	不透明
	颜色	黄灰色	乳白色
液体培养	菌膜	无	无
	浑浊	不浑浊	浑浊
	沉淀	有沉淀	无

表 3 尼古丁降解菌的个体形态特征

部位	特征	F-27	J-30
菌体	宽	$0.7 \sim 0.9 \mu\text{m}$	$0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$
	长	$3 \sim 5 \mu\text{m}$	$2 \sim 5 \mu\text{m}$
	革兰氏反应	阳性	阳性
芽孢	形状	椭圆	椭圆
	位置	中生或近中生	中生或近中生
	孢囊	不膨大	膨大

表 4 尼古丁降解菌的生理生化特征

反应名称	F-27	J-30	反应名称	F-27	J-30
蛋白胨基质	+	+	半纤维素酶	+	-
葡萄糖	+	+	尿素	-	-
木糖	-	-	阿拉伯糖	+	-
精氨酸	-	-	过氧化氢酶	+	+
蔗糖	+	+	乳糖	-	-
支链淀粉	-	-	棉子糖	-	-
甘露醇	+	-	山梨醇	-	+
纤维二糖	+	-	海藻糖	+	+
硝酸盐还原	+	+	丙酮酸	+	+
P.V 反应	-	-	pH5.7 营养肉汤	+	-

3 结语

本次试验采用平板和斜面培养基、固体和液体培养基、基础和富集培养基,结合生物降解试验,从河南烟叶表面分离筛选尼古丁降解菌,结果表明,不同菌株对尼古丁有不同程度的分解作用,富集培养法筛选尼古丁降解菌的效率明显优于基础平板培养法,是一种快速高效筛选尼古丁降解菌的理想方法。

已经发现的可代谢尼古丁的细菌有假单胞菌属^[1](如 *Pseudomonas sp.* No.41, *P. convexa* PC1, *P. putida*)、节杆菌属^[1](如 *A. ureafaciens*, *Arthrobacter nicotinoborans*)、纤维单胞菌属^[2](*Cellu-*

lomonas sp.) 以及苍白杆菌属 (*Ochrobactrum intermedium*)^[8]。本研究发现的 2 株活性较高的尼古丁降解菌, 经初步鉴定为短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) 和侧孢芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*), 这在国内外为首次报道。

我国加入世贸组织后, 烟叶市场的国际化进程加快, 中国的烟草将在更大范围直接参与国际竞争。另外, 随着社会的发展进步, 吸烟与健康问题日益引起世人关注, 开发无公害优质烟叶, 生产安全性卷烟制品已迫在眉睫。低焦油、低尼古丁、高香气的卷烟将会占据主流市场。

国内卷烟企业目前贮存的上部烟叶较多, 一般因其尼古丁含量较高而难以较多用于叶组配方中^[12], 这个问题已引起有关方面的重视, 如何降低这些烟叶中的尼古丁含量是各卷烟企业所面临的一个现实问题, 因此, 在工业上开展利用微生物对烟草进行降解尼古丁处理研究具有实际应用价值, 可以提高烟叶资源的利用率, 产生较高的经济效益和社会效益。

参考文献:

- [1] Wada E. Microbial degradation of the tobacco alkaloids and some related compounds [J]. Arch Biochem Biophys 1958, 72(1): 145—162.
- [2] Lawrence E, Gravely, Louisville Ky, et al. Process for reduction of nitrate and nicotine content of tobacco by

(上接第 47 页) 而其 5' 端的接头序列为 CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA, 包含有两条引物序列, GeneRacerTM 5' Primer 5'—CGACTGGAGCACGAGGACACTGA—3', GeneRacerTM 5' Nested Primer 5'—GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA—3', 计算的 T_m 值分别达到 61.1℃ 和 57.4℃, 都具有比较高的退火温度, 而且反转录所用的酶的最适温度为 50~55℃^[7], 而通常用的禽源反转录酶和鼠源反转录的最适反转录温度为 37℃, 所以本方法提高了反转录的特异性和随后的 PCR 反应的特异性, 为准确克隆出目的基因打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] Lagercrantz U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements [J]. Genetics, 1998, 150: 1217—1228.

microbial treatment; US, 455728Q [P]. 1978.

- [3] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, et al. Nicotine decontamination agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms [J]. Waste Manage Research, 1997, 15: 349—358.
- [4] Meher K K, Panchwagh A M, Rangrass S, et al. Biomechanation of tobacco waste [J]. Environmental Pollution, 1995, 90(2): 199—202.
- [5] Carl B, Arnold A, Hauer B et al. Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinalone degradation [J]. Gene 2004, 331: 177—188.
- [6] Koetter J W A, Schulz G. Crystal structure of 6-hydroxy-D-nicotine oxidase from *Arthrobacter nicotinovorans* [J]. J Mol Biol, 2005, 352: 418—428.
- [7] Calin-Bogdan Chiribau, Marius Mihasan, Petra Ganas et al. Final steps of nicotine in the catabolism of nicotine demethylation versus demethylation of γ -N-methylaminobutyrate [J]. FEBS Journal, 2006, 273: 1528—1536.
- [8] 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): 118—181.
- [9] 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, 27(2): 1—4.
- [10] 席宇, 宋淑红, 杨艳坤, 等. 微生物降解尼古丁的研究与应用进展 [J]. 河南农业科学, 2007(3): 9—13.
- [11] Decker K, Bleeg H. Induction and purification of steteospecific nicotine oxidizing enzymes from *Arthrobacter oxidans* [J]. Biochem Biophys Acta, 1965, 105: 313—324.
- [12] 张永安, 周冀衡, 黄义德, 等. 我国上部烟叶可用性偏低的原因分析及改善措施 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32(4): 783—785.

- [2] Maruyama K, Sugano S. Oligo-Capping. A simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides [J]. Gene, 1994, 138: 171—174.
- [3] Schaefer B C. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends [J]. Anal Biochem, 1995, 227: 255—273.
- [4] Jaakola L, Pirttilä A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. Mol Biotechnol, 2001, 19: 201—203.
- [5] Shirley B S, Hanley, Goodman H M. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations [J]. Plant Cell, 1992, 4: 333—347.
- [6] Ben-Bo Xu, Jia-Na Li, Xue-Kun Zhang, et al. Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus* [J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 350—364.
- [7] Schwabe W, Lee J E, Nathan, et al. ThermoscriptTM RT, a new avian reverse transcriptase for high temperature cDNA synthesis to improve RT-PCR [J]. Focus, 1998, 20: 30—33.