

烟碱降解细菌的分离、鉴定及其降解性能的初步研究

袁勇军 陆兆新* 黄丽金 吕凤霞 别小妹

(南京农业大学食品科技学院 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室 南京 210095)

摘 要: 从福建三明地区的土壤中分离得到一株能够高效降解烟碱的菌株, 编号为 DN2。该菌经常规的形态、生理生化分析以及 16S rDNA 序列同源性分析, 鉴定为 *Ochrobactrum intermedium*, 属于 α -变形杆菌纲。该菌在 30℃ ~ 40℃ 和 pH 6.0 ~ 9.0 范围内具有较高的降解活性, 其最适值分别为 30℃ 和 6.5, 烟碱的耐受浓度在无机盐培养基中可达到 4000mg/L。该菌能够以烟碱为唯一碳源生长, 对于 500mg/L 烟碱的降解速率为 15mg/L·h, 36h 烟碱降解率为 97.65%。该菌在烟草工业和环境保护上可能具有应用前景。

关键词: 烟碱, 生物降解, 16S rDNA, *Ochrobactrum intermedium*

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2005)02-0181-04

烟碱是普通烟草中的生物碱, 俗称尼古丁(Nicotine)^[1], 其主要作用在于它所产生的生理强度, 即通常所说的劲头, 该强度与烟碱含量成正比。烟碱对人的中枢神经有强烈的刺激和麻痹作用, 少量使人兴奋, 大量会引起眩晕、呕吐甚至中毒死亡, 成人一次摄入 40mg ~ 60mg 尼古丁, 就可能致命^[2]。因此, 烟草中的烟碱含量过高, 就会严重危害烟民的健康。

我国部分烟区所产烟叶, 尤其是上部烟叶烟碱含量偏高。据报道^[3], 目前我国烤烟烟碱平均含量为 3% ~ 4%, 白肋烟高达 6%, 而正常情况下烤烟应低于 3%, 白肋烟应在 2% ~ 4%。国内各大烟厂贮存的上部烟叶较多, 一般因其烟碱含量较高, 而不易用于叶组配方中。近年来, 随着世界范围反吸烟运动的不断深入和消费者对自身健康的更加关注, 几乎所有类型的卷烟产品都在向低焦油和低烟碱的淡味型卷烟方向发展, 且其发展速度十分迅猛。虽然目前已有一些降低烟草中烟碱含量的方法, 如农业措施^[4]和浸提法^[5], 但这些技术在降低烟碱的同时, 也会降低那些对香烟品质有贡献的成分。

利用微生物降解技术降低烟碱含量, 不仅高效, 而且具有选择性, 对香烟的主要品质不会产生不利的影响^[6]。本研究从长期种植烟叶的福建三明地区的土壤中分离到一株菌, 具有彻底降解烟碱的能力。本文报道该菌的分离、鉴定及其相关降解性能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 采样地点: 分离菌株的土壤样品采自福建三明烟区。

1.1.2 试剂和器材: Nicotine(含量 $\geq 99\%$, Merck 公司); 紫外分光光度计(UV-2540, 日本岛津公司); PCR 仪(PTC-100™, MJ Research 公司); 离心机(5804R, Eppendorf 公司); 透射电镜(JEM-1200EX/S, JEOL 公司)。

1.1.3 培养基: 基础培养基: NH_4NO_3 1.00g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50g, KH_2PO_4 0.50g, NaCl 0.50g, 酵母膏 0.05g, K_2HPO_4 1.50g, 补蒸馏水到 1000mL, pH 7.0。富集培养基: 蛋白胨 10.0g, NaCl 1.0g, K_2HPO_4 1.0g, 补蒸馏水到 1000mL, pH7.0。普通培养基: 牛肉膏 3.0g, 蛋白胨 10g, NaCl 5.0g, 补蒸馏水到 1000mL, pH 7.0 ~ 7.2。金氏培养基 B: 蛋白胨 20g, 甘油 10g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g, K_2HPO_4 1.5g, 琼脂 15g, 补蒸馏水到 1000mL, pH 7.2。以上培养基 121℃ 高压蒸汽灭菌 30min。烟碱用 0.22 μm 滤膜过滤后根据需要加入。

1.2 降解菌的富集与分离

1.2.1 降解菌的富集与分离: 参照文献[7]进行。

1.2.2 降解能力的确定: 将分离纯化得到的菌株接种到基础培养基中(烟碱浓度为 500mg/L), 30℃,

* 通讯作者。Tel 86-25-84396583; Fax 86-25-84396431; E-mail: fmb@njau.edu.cn

作者简介: 袁勇军(1976 -), 男, 安徽六安人, 博士研究生, 主要研究方向为食品微生物及其生物技术。E-mail: yyyj132618@sina.com.cn

其他作者: 武宁

收稿日期: 2004-07-02, 修回日期: 2004-11-15

120r/min 摇床培养,用不接菌的基础培养基作空白对照。取不同时间培养液,10000r/min 离心 8min,上清液用一定量的 0.05mol/L HCl 稀释到合适的吸光值范围。以 0.05mol/L HCl 作参比液,在波长 200nm ~ 400nm 范围内进行紫外扫描,观察烟碱在 258nm 处特征吸收峰的变化情况。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态结构观察及生理生化实验:参照文献 [8] 进行。

1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定:细菌总 DNA 的提取参照文献 [9] 的方法。用于 16S rDNA 的 PCR 反应的引物为一对通用引物^[10](由北京三博远志生物技术有限公司合成)。正向引物 fD1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(*Escherichia coli* 对应位置 8-27)和反向引物 rP1:5'-ACGGTTACCTTGT-TACGACTT-3'(*E. coli* 对应位置 1491-1511)。PCR 反应体系 (50 μ L):10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP (2.0mmol/L)4 μ L, 10 μ mol/L 引物 fD1 和 rP1 各 1 μ L, 模板 DNA 20ng, *Taq* 酶 1.0U, 超纯水 37 μ L。PCR 条件 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物的纯化和测序由上海博亚生物技术公司完成。测序结果利用 Blast 在非重复的 GenBank + EMBI + PDB 基因库中进行同源性比较并将其鉴定到种。

1.4 基础培养液中烟碱含量的测定

改进的紫外分光光度法^[11]:以波长 258nm 处的吸光值表示。样品处理方法同 1.2.2。标准曲线 $y = 0.0316x + 0.0027$, $r = 0.9998$ 。

1.5 菌体生长量的测定

采用分光光度法^[12],以光吸收值 OD_{600} 表示。

2 结果和分析

2.1 烟碱降解菌分离和确定

经富集分离,筛选到 16 株能够耐受烟碱的细菌,编号分别为 DN1-DN16。将分离得到的菌株进行降解烟碱能力的确定,结果发现有 5 株细菌能够降解烟碱,其中以菌株 DN2 的降解能力最强。接种 DN2 的培养液在波长 258nm 处的烟碱吸收峰值随着培养时间的增加而逐渐降低,在此过程中在波长 290nm 处形成 1 个新的吸收峰。32h 后这些峰完全消失,而空白对照在 258nm 处的吸收峰在此过程中未发现变化。这表明 DN2 具有降解烟碱的能力。

2.2 菌株 DN2 的鉴定

生理生化实验结果表明,菌株 DN2 革兰氏染色

阴性,无芽孢,短杆状,电镜观察其有 2 根端生鞭毛(图 1),在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上菌落白色,光滑,边缘整齐。接触酶、氧化酶反应呈阳性,严格好氧,能以烟碱为唯一碳源进行生长,最适生长温度为 30 $^{\circ}$ C 和 pH 为 7.0,氧化葡萄糖产酸,硝酸盐还原阳性,伏-普试验(V.P.)甲基红试验(M.P.)反应阴性,在金氏培养基 B 中不产生水溶性色素,该菌不水解淀粉和明胶,能够利用葡萄糖、麦芽糖等,对黏菌素不敏感。初步鉴定为中间苍白杆菌(*Ochrobactrum intermedium*)。



图 1 菌株 DN2 的电镜照片(25000 \times)

Fig. 1 Electron micrograph of the strain DN2 (25000 \times)

菌株 DN2 的 16SrDNA 序列长度为 1361bp,在 GenBank 中的登录号为 AY654453。序列同源性分析表明,菌株 DN2 与苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)中 *Ochrobactrum intermedium* 的 4 个菌株同源性均在 99% 以上的。结合该菌的形态特征和生理生化性状,最终将 DN2 菌株鉴定为 *Ochrobactrum intermedium*,属于 α -变形杆菌细菌纲。

2.3 DN2 对烟碱降解特性的研究

2.3.1 温度和培养基初始 pH 对菌株 DN2 生长和对烟碱降解的影响:预先在普通培养基中培养的 DN2 菌株培养液按 5% 的接入量接种于含烟碱(500mg/L)的基础培养基中,分别在 120r/min 的摇床,不同温度条件下和不同初始 pH(温度为 30 $^{\circ}$ C)的培养基摇床培养 24 h,测定细胞的生长和烟碱降解情况。结果表明,菌株 DN2 在 25 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C 范围内可以生长,在 30 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C 范围内生长良好且差异不大。菌株 DN2 的最适生长温度为 30 $^{\circ}$ C,在该温度下,达到最大的生长量和最高的烟碱降解率。该菌在 pH6.0 ~ 8.0 范围内菌株生长良好。细胞生长的最适 pH 为 6.5,在该 pH 条件下, DN2 达到最大的生长量,对烟碱的降解率也最高。

2.3.2 烟碱的降解速率与 DN2 的生长速度的关系:预先在普通培养基中培养的 DN2 菌株培养液按 5% 的接入量接种于含烟碱(500mg/L)的基础培养基中,在 30 $^{\circ}$ C、120r/min 条件下摇床培养,定时取样测定菌

体的生长情况和培养基中烟碱的浓度。图 2 表明, 菌株 DN2 细胞的生长和对烟碱的降解是同步的。菌株 DN2 生长和对烟碱的降解都有短暂的延滞期, 然后进入对数期, 到 36 h 基本上达到最大生长量, 此时烟碱的降解率达 97.65%。

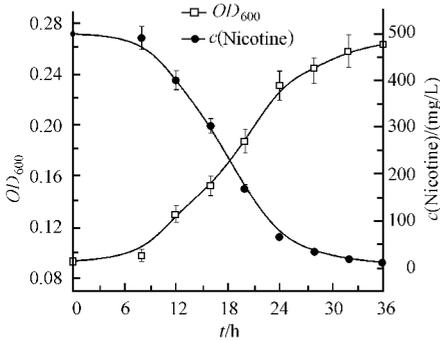


图 2 菌株 DN2 对烟碱的降解情况

Fig.2 The growth and degradation curve of strain DN2

2.3.3 耐受浓度试验 菌株 DN2 在普通培养基中培养至对数后期, 以 10% 的接种量接种至基础培养基中, 分别添加不同浓度烟碱为碳源, 30℃, 120r/min 摇床培养 48h 取样测定菌株生长和对烟碱的降解情况。结果表明, 当烟碱的浓度低于 2000mg/L 时, DN2 菌株能完全降解烟碱, 同时细胞的生长随烟碱浓度的提高而增强, 2000mg/L 时达到最大 OD 值。而当烟碱浓度高于 2000mg/L 时, 细胞的生长和对烟碱的降解均呈下降趋势。烟碱浓度达到 5000mg/L 时, DN2 菌株基本不能生长, 底物作用明显, 对烟碱的降解也停止。

3 讨论

本研究从土壤中分离到一株能够利用烟碱作为唯一碳源的细菌, 经常规的形态、生理生化分析以及 16S rDNA 序列同源性分析, 鉴定为 *Ochrobactrum intermedium*, 命名为 DN2。菌株 DN2 降解烟碱的最佳条件为温度 30℃、pH6.5, 在此条件能达到最佳生长状况和最大降解率。初始浓度为 500mg/L 的烟碱, 经过 36 h 培养, 菌株 DN2 的降解率接近 100%。而 Schenk 等^[13]分离的 *Arthrobacter nicotinovorans* 达到同样的效率需要 56 h 以上, 说明该菌降解烟碱的效率。这为该菌在实际应用中提高效率、节约成本打下基础。

烟碱是高毒性的化合物, 能够降解烟碱的微生物相当少。目前已知的烟碱降解菌主要有: 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[6], 纤维单胞菌(*Cellulomonas* sp.)^[6], 烟草节杆菌(*Arthrobacter nicoti-*

anae)^[13], 噬烟碱节杆菌(*Arthrobacter nicotinovorans*)^[14], 争论产碱菌(*Alcaligenes paradoxus*)^[14], 球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)^[15]等。已经有报道苍白杆菌属内的一些细菌具有使芳香环化合物开环的能力^[16~19], 但是国内外未见 *Ochrobactrum intermedium* 具有这种降解特性的报道。

Ochrobactrum intermedium 是 1998 年新鉴定的一个种, 其降解烟碱的机理、应用以及安全性检测等有待于深入研究。

参 考 文 献

- [1] Davis D L, Nielsen M T. 烟草-生产, 化学和技术. 国家烟草专卖局科技教育司, 中国烟草科技信息中心, 等译. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] 金博闻, 戴 亚. 烟碱的合成、代谢和作用. 烟草科技, 1995, (1): 14-16.
- [3] 张彦东, 罗昌荣, 王辉龙, 等. 微生物降解烟碱研究进展. 烟草科技, 2003 (12): 3-7.
- [4] 王广山, 陈卫华, 薛超群, 等. 烟碱形成的相关因素分析及降低烟碱技术措施. 烟草科技, 2001 (2): 38-42.
- [5] Lenkey A. Nicotine removal process and product produced thereby; maxing with alkaline agent in aerobic environment. United States Patent, 1989, No. 4848373.
- [6] Gravelly L E, Geiss V L, Newton R P. Process for maximizing the growth and nicotine degrading activity of microorganisms. United States Patent, 1977, No. 4011141.
- [7] 李阜棣, 喻子牛, 何昭江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996, 140-141.
- [8] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 349-398.
- [9] Sambrook J, Russel D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 王嘉玺, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, **173** (2): 697-703.
- [11] 金闻博, 戴 亚. 烟草化学. 北京: 清华大学出版社, 1994, 149.
- [12] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, 99-100.
- [13] Giovannonzi-Sermanni G. *Arthrobacter nicotianae*, a new type of *Arthrobacter* causing nicotine degradation. *Coresta*, 1959 **3**: 2595.
- [14] Uchida S, Maeda S, Masubuchi T, et al. Isolation of nicotine-degrading bacteria and degradation of nicotine in shredded tobacco and tobacco extract. *J Sci Pap*, 1976, **118**: 197-201.
- [15] Schenk S, Hoelz A, Krau B, et al. Gene structures and properties of enzymes of the plasmid-encoded catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans*. *J Mol Biol*, 1998, **284**: 1323-1339.
- [16] Bongkeun S, Palleroni N J, Haggblom M M. Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3446-3453.

- [17] Lechner U , Baumbach R , Becker D , *et al.* Degradation of 4-Chloro-2-Methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. *J Mol Biol* , 1995 , 6 : 83 - 92.
- [18] Wael S E S , Mohamed K I , Mohamed A S , *et al.* Isolation and

identification of a novel strain of the genus *Ochrobactrum* with Phenol-degrading activity. *J Biosci Bioeng* , 2003 , 96 (3) : 310 - 312.

- [19] 任源,吴超飞,韦朝海.苯胺分解菌的驯化筛选研究.环境科学研究,1998,11(4):3-5.

Isolation and identification of a strain DN2 degrading nicotine

YUAN Yong-jun LU Zhao-xin* HUANG Li-jin LV Feng-xia BIE Xiao-mei

(Key Laboratory of Food Processing and Quality Control of Ministry of Agriculture , College of Food Science & Technology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : A bacterial strain which was able to utilize nicotine as its sole carbon source was isolated from soil in which tobacco had grown at Sanming region in Fujian Province and named as DN2. Upon chemotaxonomic characterization and phylogenetic inference based 16S rDNA analysis , the strain DN2 was identified as α -proteobacteria , *Ochrobactrum intermedium* . For DN2 degrading nicotine , the optimal pH and temperature is 6.5 , 30°C respectively. It can tolerate high-concentration of nicotine up to 4000mg/L in basal media. Using 500mg/L nicotine as its sole carbon , the strain was able to degrade 15mg/L of nicotine per liter per hour and reached its stationary phase in about 36 hours.

Key words : Nicotine , Bioegradation , 16S rDNA , *Ochrobactrum intermedium*

* Corresponding author. Tel 86-25-84396583 ; Fax 86-25-84396431 ; E-mail : fmb@njau.edu.cn

Other author : WU Ning

Received date : 07-02-2004

《微生物学报》近况通报

为了提高学术期刊质量,鼓励科技工作者发表高水平的学术论文,促进学科发展和人才成长,中国科协学术交流工作委员会决定:从2003年起,开展“中国科协期刊优秀学术论文评比活动”,每年评选一次。2004年7月《微生物学报》推荐中国科学院微生物研究所陈远童等人的论文参加第二届评比活动(陈远童,庞月川,郝秀珍.微生物发酵生产十三碳二元酸的研究.39(3):279-281)经专家评审委员会评审,此文荣获第二届中国科协期刊优秀学术论文奖,全国共计99篇科技论文获此殊荣。

本刊编辑部希望能有更多的作者参与此项活动,明年将是第三届,若您在2000-2004年有文章刊登在本刊,欢迎您于2005年6月30日前将一些相关的证明材料(详见以下3条)寄回到本刊编辑部,信封上请注明:优秀论文评比。今后我们将进一步改进工作,更好的为科研工作者服务,使本刊成为您真正的朋友,以下为参加优秀论文评比时需要提供的材料。

1. 在2000~2004年,发表在本刊的论文或相关成果的获奖情况(包括2000年前发,2000年后获奖的),包括:论文题目、作者、发表时间(年-卷-期-页码)、获奖名称(国家、省部级),并提供奖状或证书复印件一份。

2. 在2000~2004年,由于论文或相关成果在本刊发表,促进了相关研究成果在应用和推广中获得的经济效益和社会效益情况。包括:论文题目、作者、发表时间(年-卷-期-页码),并提供经济效益的证明材料(包括转让金额、投产规模、专利等)(加盖公章),提供社会效益的简单文字材料。

3. 您的论文被国内外权威检索系统(检索期刊和数据库)收录情况。