

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (12) :1543 – 1550; 4 December 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150157

降解烤烟秸秆和烟碱菌株的筛选及其产酶特性

苏玉龙^{1,2}, 王倩^{1,2}, 张成省^{1,2}, 顾金刚³, 史素娟^{1,4}, SM Nuruzzaman Manik^{1,2},
毛静静^{1,2}, 李世贵³, 雷强⁵, 伍仁军⁵, 殷英⁵, 屈健康⁵, 李亮⁶, 刘好宝^{1,2*}

¹农业部烟草生物学与加工重点实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101

²中国农业科学院研究生院, 北京 100081

³中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

⁴青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东 青岛 266109

⁵四川省烟草专卖局, 四川 成都 610041

⁶云南省烟草公司临沧市永德分公司, 云南 临沧 677600

摘要: 【目的】为获得能够降解烤烟秸秆和烟碱的菌株, 并探索其降解烤烟秸秆的利用途径。【方法】以烤烟秸秆为唯一碳氮源, 从烟田土壤中进行了菌株的筛选。采用形态学观察、生理生化特性鉴定、16S rRNA基因序列鉴定等方法对该菌株进行了鉴定, 并对其以烤烟秸秆为底物进行液态发酵的产酶活性和木质纤维素降解效果进行了测定。【结果】结果表明: 该菌株为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。在以烤烟秸秆为主要营养物质液态发酵条件下该菌株具有较强的木质素降解能力, 最大漆酶活力达到 418.52 U/L, 而木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶的最大酶活分别为 19.71 U/L 和 64.71 U/L。此外, 发酵 20 d 后该菌能够完全降解发酵液中的烟碱。【结论】本研究筛选到了 1 株能够较好降解烤烟秸秆和完全降解烟碱的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 且该菌株具有利用烤烟秸秆生产漆酶的应用价值。

关键词: 巨大芽孢杆菌, 降解烟碱, 降解烤烟秸秆, 漆酶

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1543-08

我国作为烤烟生产大国, 每年都有大量的烟草秸秆废弃物产生, 烤烟秸秆的回收利用是限制烟草农业可持续发展的主要问题之一。目前烤烟秸秆可被用来提取化学物质、制取活性炭、生产纤维板、烟草薄片、生产生物有机肥和作为营养基质培养食用菌等^[1-3]。其中提取化学原料、制取活性炭和生产纤维板回收成本较高, 并且存在潜在的环境污染危

害, 使得这些技术的推广应用并不广泛, 烤烟秸秆仍以直接焚烧为主, 造成环境污染和资源浪费。秸秆生物降解利用作为一种简便、环保、应用途径广泛的秸秆利用方式逐渐受到人们的重视。但目前关于烤烟秸秆生物降解利用的研究还较少, 较高的木质化程度和一定程度的烟碱含量是烤烟秸秆生物降解利用受到限制的主要因素^[4]。较高的木质化程度使

基金项目: 四川省烟草专卖局重点项目 (201101006, 201202006); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012ZL058)

* 通信作者。E-mail: Liuhaobao@caas.cn

作者简介: 苏玉龙 (1991 -), 男, 河南新郑人, 作物栽培学与耕作学专业研究生, 研究方向为烤烟秸秆生物降解利用。E-mail: 15290837059@163.com

收稿日期: 2015-04-03; **修回日期:** 2015-05-14

得能够有效降解烤烟秸秆的微生物资源较少,烟碱则容易流失到水体中造成环境污染^[3]。因此,目前烤烟秸秆生物降解利用的重点是获得同时降解烤烟秸秆和烟碱的微生物菌株,并探索其降解烤烟秸秆的利用途径。

本研究的主要目的就是筛选获得能够降解烤烟秸秆和烟碱的细菌菌株,丰富降解烤烟秸秆的微生物资源,消除烟碱在烤烟秸秆回收利用过程中对水体的污染,并探索筛选到菌株降解烤烟秸秆的应用途径,为烤烟秸秆资源的生物降解利用提供更多的理论依据。

1. 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 土样来源及处理方法:土壤样品取自云南省临沧市永德烟草试验站植烟土壤,置于自封袋中4℃保存备用。

1.1.2 烤烟秸秆来源及预处理方法:烤烟秸秆取自山东省诸城市王洛烟草试验站烟田,将烤烟秸秆剪碎成3-5 cm长,用试验型高速万能粉碎机(型号LK100)粉碎,过50目筛后的粉末经105℃烘干至恒重后保存在自封袋中备用。

1.1.3 培养基:(1)平板初筛培养基(g/L):烤烟秸秆粉末10,琼脂15,自然pH值,121℃灭菌20 min。(2)分离纯化培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母浸膏5,NaCl 10,琼脂15,自然pH值,121℃灭菌20 min。(3)LB斜面培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母浸膏5,NaCl 10,琼脂15,自然pH值,121℃灭菌20 min。(4)液体发酵培养基(g/L):烤烟秸秆粉末10,自然pH值,121℃灭菌20 min。(5)NA培养基(g/L):蛋白胨10,牛肉粉3,NaCl 5,琼脂15,pH7.3±0.1,121℃灭菌20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选方法:称取适量保存在冰箱内的土样,按照1 g/10 mL的比例用无菌水振荡活化12 h(180 r/min),8000 r/min离心2 min,取上清液梯度稀释成 10^{-1} 和 10^{-2} 倍。涂布接种到平板初筛培养基上,37℃恒温培养3-5 d,挑取能够在初筛培养基上生长的细菌菌株在LB培养基上进行划线分离纯化,最后保存在LB斜面培养基上。

1.2.2 菌株鉴定方法:形态学鉴定:将纯化的菌株

在NA培养基上划线培养,连续几天观察菌株生长状况、菌落形态及培养特征。依据《常见细菌系统鉴定手册》对筛选到的细菌进行鉴定^[5]。

16S rRNA 基因序列分析:用LB液体培养基对筛选到的菌株进行发酵培养,37℃、180 r/min恒温振荡培养8-12 h后用细菌DNA提取试剂盒(Omega公司)提取细菌基因组DNA。采用通用引物fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和rP2(5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增^[6],PCR扩增程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,30个循环;72℃ 10 min,产物保存在4℃备用。PCR产物送华大基因科技股份有限公司进行测序,测序产物在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站基因库中进行序列比对。选取相似度较高的菌株构建系统发育进化树,采用MEGA 5.1软件进行系统发育进化树的构建,构建方法为Neighbor-Joining,Bootstrap设定为1000,其余各项参数均为默认值。

脂肪酸成分分析:通过微生物脂肪酸快速鉴定系统(MIDI)检测菌株的脂肪酸组成。脂肪酸提取方法及气相色谱检测程序参考MIDI Sherlock推荐方法^[7]。

1.2.3 菌株液体发酵培养:将保存在LB斜面上的菌株转接到LB液体培养基中活化培养后,转接到液体发酵培养基中,接种量为每50 mL液体发酵培养基接种菌株活化液5 mL。37℃、220 r/min恒温振荡培养。

1.2.4 粗酶液的制备及酶活指标的测定:自接种之日起每隔5 d从液体发酵培养液中吸取5 mL发酵液,12000 r/min离心2 min后取上清即为粗酶液。所有酶活指标的测定均做3次重复。

木质素氧化酶类酶活测定:木质素过氧化物酶(LiP)活性根据藜芦醇氧化法测定^[8],一个酶活力单位定义为每分钟氧化1 μmol藜芦醇所需要的粗酶液的量。锰过氧化物酶(MnP)活性依照Mn²⁺氧化法测定^[9],一个酶活力单位定义为每分钟氧化1 μmol Mn²⁺所需要的粗酶液的量。漆酶酶活用ABTS法测定^[10],一个酶活力单位定义为每分钟氧化1 μmol ABTS所需要的粗酶液的量。

纤维素氧化酶类酶活测定:选取滤纸酶(FP酶)、羧甲基纤维素酶(CMC酶)和微晶纤维素酶(C1酶)作为纤维素酶类酶活衡量指标。酶活测定

用 DNS 法^[11], 一个酶活力单位定义为每分钟还原相应底物得到 1 μmol 葡萄糖所需要的粗酶液量。

1.2.5 发酵产物中烟碱含量的测定: 为确定筛选菌株的烟碱降解能力, 采用盐酸萃取吸光度法对发酵浸提液中的烟碱含量进行了测定^[12]。烟碱含量的测定自接种后每隔 5 d 测定 1 次, 每次测定做 3 次重复, 烟碱含量按公式 (1) 计算。

$$\text{烟碱含量}(\%) = 1.059 \times [A_{259} - 0.5 \times (A_{236} + A_{282})] \times 100 \times 100 / W \times (1 - \text{水}\%) \times 34.3 \times 1000$$

公式 (1)

其中 1.059 为矫正系数; W 为干样重; 34.3 为烟碱的吸光系数 (1000 mL 蒸馏水中含有 1 g 烟碱溶液的吸光度);

1.2.6 烤烟秸秆发酵终产物中木质纤维素含量的测定: 液态发酵产物在 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 后过滤收集剩余固体残渣, 55 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重后参照 Van Soest^[13] 的木质纤维素定量方法, 测定其中的木质素、纤维素和半纤维素含量, 以未发酵烤烟秸秆为对照, 并计算出烤烟秸秆各木质纤维素组分的相对降解效率。对照和发酵产物均做 3 次重复。

2 结果和分析

2.1 菌株筛选及鉴定结果

2.1.1 形态学特征鉴定: 形态学鉴定是细菌鉴定最基本、最简单、最快速的鉴定方法, 可初步判断细菌的种属。本研究从初筛培养基上分离得到一株细菌菌株, 编号为 I, 形态学特征鉴定结果表现为: 在 NA 培养基上形成边缘整齐的菌落, 白色, 不透明, 后期边缘不整齐 (图 1); 菌体革兰氏染色阳性, 生成内生芽孢 (图 2)。

2.1.2 脂肪酸成分分析结果: 脂肪酸成分分析是较形态学鉴定更为简便和准确的细菌鉴定方法。细菌细胞结构中含有的脂肪酸成分与细菌 DNA 具有高度的同源性, 因此可以通过脂肪酸成分分析准确判断细菌的种属。本研究筛选到菌株 I 的菌体脂肪酸成分气相色谱分析结果见图 3, 菌株 I 的主要脂肪酸为 C15:0 iso, 含量为 37.96%, C15:0 anteiso 含量为 39.07%, 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 的典型脂肪酸类型。

2.1.3 16S rRNA 基因序列鉴定结果: 为准确确定菌株 I 的种类, 对其进行了 16S rRNA 基因序列鉴

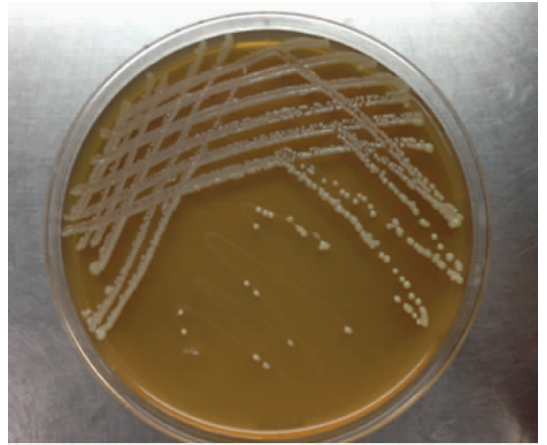


图 1. 菌株 I 在 NA 培养基上的形态特征

Figure 1. The morphological characteristic of strain I grew on the NA medium.

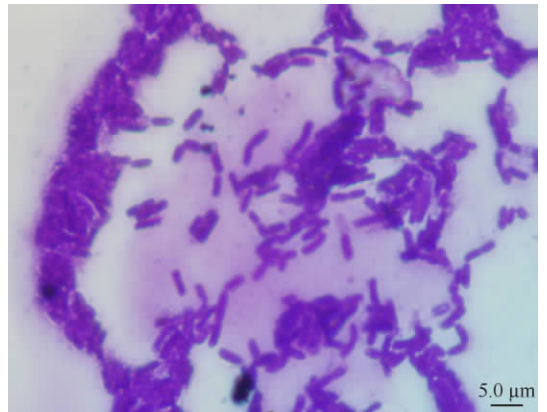


图 2. 菌株 I 显微形态特征

Figure 2. The microscopic character of strain I.

定。采用通用引物扩增得到菌株 I 的 16S rRNA 基因序列长度为 1365 bp, GenBank 基因库登录号为 SUB861909 SEQ1 KP903365。在 NCBI 网站中运用 BLASTn 程序与数据库中已提交的细菌 16S rRNA 基因序列进行相似性比较分析, 挑选与菌株 I 相似度较高菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树 (图 4)。相似度比较分析结果表明菌株 I 与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和阿耶多芽孢杆菌 (*Bacillus aryabhatai*) 的相似度较高, 均达到 99% 以上, 其中与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的相似度最高, 为 99.92%。

综合形态学特征鉴定、脂肪酸成分分析和 16S rRNA 基因序列分析结果, 最终鉴定菌株 I 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。

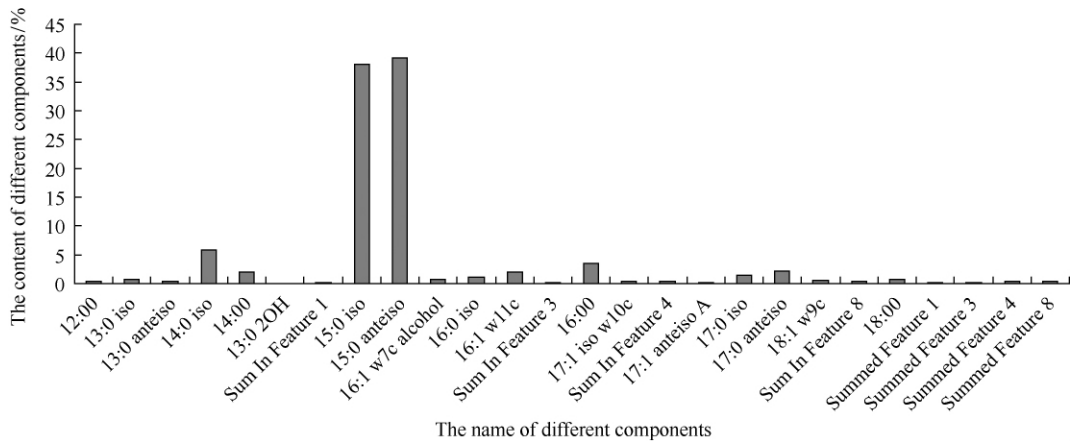


图 3. 菌株 I 的脂肪酸组成成分

Figure 3. The fatty acid components of strain I.

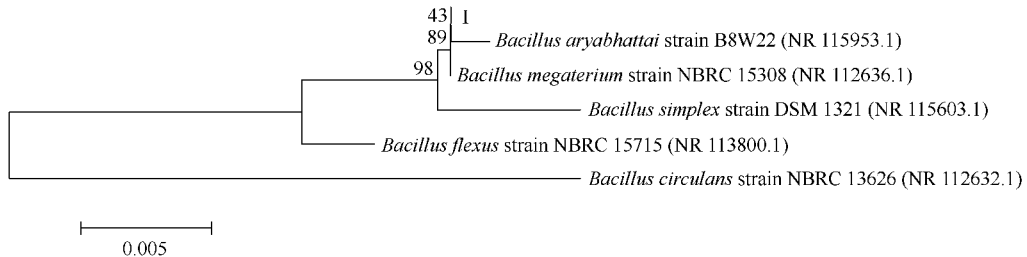


图 4. 菌株 I 和相似菌株的系统发育进化树

Figure 4. Phylogenetic tree of strain I and some related species. Numbers at branching points refer to bootstrap values (1000 resamplings), 0.005 was sequence divergence. The sequences accession number in GenBank of the strains was shown in parentheses.

2.2 菌株液体发酵产酶活性

2.2.1 液体发酵产木质素氧化酶类活性: 木质素氧化酶类活性是衡量菌株对烤烟秸秆木质素降解能力的重要指标,本研究选取了 Lac 酶、LiP 酶和 MnP 酶 3 个最常见的木质素氧化酶类作为菌株 I 产木质素氧化酶类的衡量指标。酶活测定结果见图 5,在以烤烟秸秆为主要营养物质进行液态发酵条件下,菌株 I 具有产 3 种木质素氧化酶的能力。其中,菌株 I 产 Lac 酶的能力最强,接种后第 10 天漆酶活性达到 418.52 U/L;产 MnP 酶的能力次之,发酵后的第 15 天, MnP 酶活性达到最大值 64.71 U/L;产 LiP 的能力最差, LiP 酶最大酶活只有 19.71 U/L。MnP 酶和 LiP 酶的活性远远低于 Lac 酶活性。3 种木质素氧化酶酶活维持时间与酶活性大小表现出相同的趋势, Lac 酶活性维持时间最长,自发酵起第 5 天至第 15 天均表现出 Lac 酶活性, LiP 酶活性则仅在发酵后的第 10 天和第 15 天被检测到。综合看来,菌株 I 具有较好的利用烤烟秸秆产漆酶的能力,具有一定的研究价值。

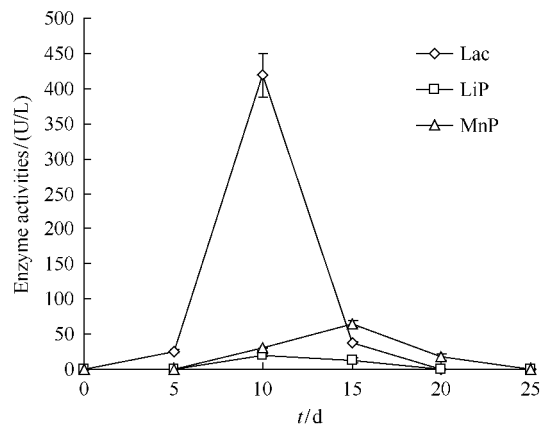


图 5. 液态发酵条件下菌株 I 利用烤烟秸秆产木质素氧化酶类酶活变化

Figure 5. The ligninase enzyme activity of strain I when fermented with tobacco straw in liquid state.

2.2.2 液体发酵产纤维素氧化酶类活性: 为确定菌株 I 利用烤烟秸秆产纤维素氧化酶的能力,本文选取了 CMC 酶、FP 酶和 C1 酶 3 个酶活指标,测定了菌株 I 不同发酵时期利用烤烟秸秆产纤维素酶的活

性。酶活测定结果见图 6, 以烤烟秸秆为主要营养物质液态发酵条件下菌株 I 的总纤维素酶活性(滤纸酶)在发酵后第 10 天达到最大, 为 0.35 U/mL; CMC 酶活性发酵后第 10 天同样达到最大值 0.46 U/mL; C1 酶活力则在发酵后第 15 天达到最大, 为 0.48 U/mL。各类纤维素酶活性变化基本一致, 发酵后第 25 天纤维素酶活性均显著下降。

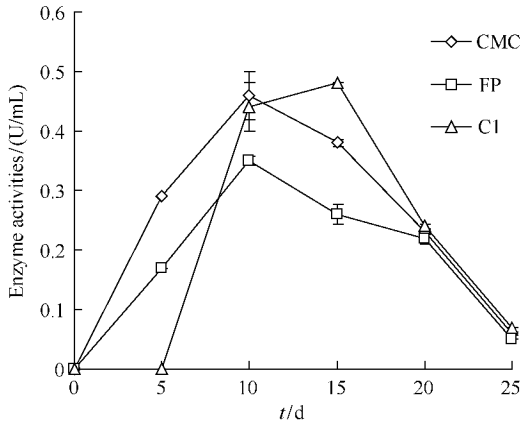


图 6. 液态发酵条件下菌株 I 利用烤烟秸秆产纤维素氧化酶类酶活变化

Figure 6. The cellulose enzyme activity of strain I in liquid when fermentation with tobacco straw.

2.3 发酵产物中的烟碱含量

发酵产物烟碱含量高低对烤烟秸秆发酵产物的生态和生物安全性具有重要影响。测定了不同发酵时期, 发酵浸提液中的烟碱含量变化, 以确定菌株 I 对烟碱的降解能力。不同发酵时期发酵液中烟碱含量见图 7, 随着发酵时间的延长, 发酵产物中的烟碱含量逐渐降低, 在发酵后的第 5-10 天烟碱含量表现出明显下降的趋势, 发酵后第 10 天烟碱含量已低于固体有害废弃物最低烟碱含量要求, 发酵后第 20 天发酵产物中已无烟碱被检测到。说明菌株 I 不仅具有耐烟碱降解烤烟秸秆的能力, 而且具有降解烟碱的能力, 可以完全降解烤烟秸秆浸提液中的烟碱, 对于烤烟秸秆废弃物无害化处理具有重要的应用价值。

2.4 菌株对烤烟秸秆的降解效果

为了确定菌株 I 对烤烟秸秆木质纤维素的降解效果, 对未发酵烤烟秸秆和发酵 20 d 后烤烟秸秆中木质素、纤维素和半纤维素含量进行了测定, 结果见图 8。从图中可以看出, 液态发酵 20 d 后菌株 I 对烤烟秸秆中的木质纤维素各组分均有一定程度的降

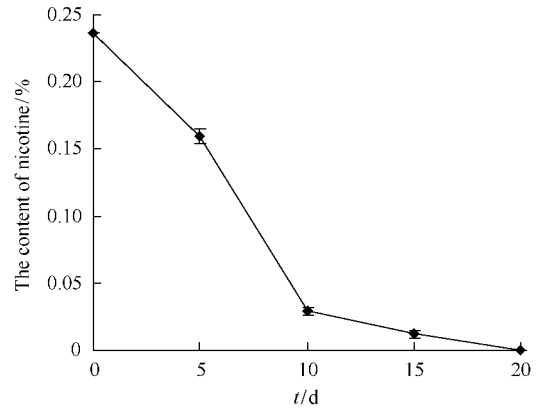


图 7. 液态发酵条件下发酵产物中的烟碱含量

Figure 7. The nicotine concentration in fermentation products during the liquid fermentation.

解。其中, 木质素的相对降解率最高, 达到了 18.12%, 半纤维素和纤维素的相对降解率分别为 12.63% 和 10.39%。总体看来, 菌株 I 对烤烟秸秆木质纤维素的降解程度较为明显。其中, 对木质素的降解程度明显高于对纤维素和半纤维素的降解程度, 烤烟秸秆降解产物的回收利用应集中在去木质化回收纤维素应用途径中。

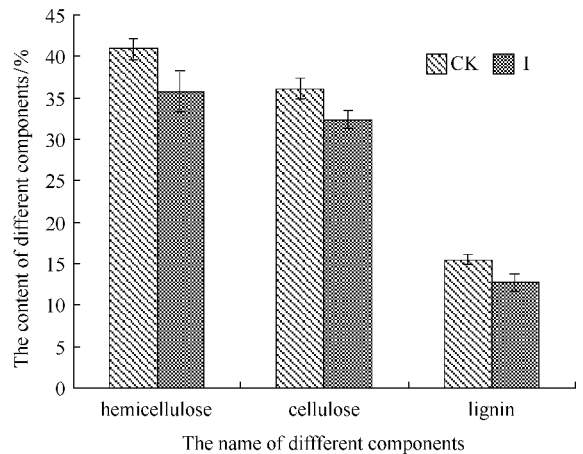


图 8. 液态发酵 20d 后烤烟秸秆中木质纤维素各组分含量

Figure 8. The lignocelluloses content in tobacco straw 20 days after fermented in liquid state.

3 讨论

3.1 烤烟秸秆生物降解菌株的筛选

目前烤烟秸秆的生物降解利用研究主要集中在真菌或复合菌剂, 已证明具有烤烟秸秆降解能力的

真菌菌株包括曲霉菌 (*Aspergillus* sp.)、粘头霉菌 (*Moniliales Glocephalias* sp.) 等^[14-15]。虽然真菌菌株的烤烟秸秆降解效果已较为理想,但其培养周期较长、保存运输不便的缺点限制了烤烟秸秆生物降解利用的推广。筛选能够降解烤烟秸秆的细菌菌株将更有利于实现烤烟秸秆生物降解利用的推广。本研究首次证明了巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 具有单独降解烤烟秸秆的能力,对于降解烤烟秸秆细菌菌株筛选的研究具有重要的理论指导意义。

3.2 细菌菌株对烤烟秸秆的降解效果

本研究表明,在液态发酵 20 d 后巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 对烤烟秸秆木质素的降解率为 18.12%,要明显低于李红亚等^[16]采用细菌液态发酵玉米秸秆 16 d 后 24% 的木质素降解率。产生该结果的原因可能包括以下两个方面:一是烤烟秸秆木质化程度高于普通作物秸秆,使其较普通作物秸秆相比更难被降解;二是本研究并未对发酵条件进行优化。本研究还证明了液态发酵 20 d 后巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 对烤烟秸秆木质素 (相对降解率 18.12%) 的降解率要明显高于对纤维素 (相对降解率 10.39%) 和半纤维素 (相对降解率 12.63%) 的降解率,这与 Chang Young-Cheol 等^[17]的研究结果一致,说明巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 对木质素和纤维素的降解具有一定的选择性。因此,本研究下一步的研究重点是优化发酵培养条件,加快降解速率并侧重于实现木质素的选择性降解,为烤烟秸秆中纤维素的回收利用提供有效途径。

烤烟秸秆的生物降解利用不仅要实现木质纤维素的降解,还要实现烟碱的降解。烟碱作为烤烟秸秆中独有的化学物质,使烤烟秸秆在回收利用过程中存在潜在的地下水污染风险,并有可能危害生物健康。因此,如何实现烤烟秸秆回收产品的无害化处理一直是烤烟秸秆回收利用研究的重点。虽然烟碱的生物降解研究已获得丰富的烟碱降解菌株^[3],但这些菌株应用于烤烟秸秆降解的研究却鲜有报道。本研究筛选到的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 除了具有能够降解烤烟秸秆的能力,同样被证明具有降解烟碱的能力,发酵 20 d 后可完全

降解烤烟秸秆中的烟碱,可有效解决烤烟秸秆生物降解利用过程中的烟碱污染问题,若能够改善烤烟秸秆作为饲料的适口性问题,将有利于实现烤烟秸秆的饲料化生产。

3.3 细菌菌株降解烤烟秸秆的产酶特性及其应用前景

本研究筛选到的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 同时具有利用烤烟秸秆生产纤维素酶和木质素氧化酶的能力。在酶活性变化方面,纤维素酶活性的变化趋势较为平缓,木质素氧化酶活性的变化趋势较为剧烈。Lac 酶的活性在发酵过程中出现了较为剧烈的波动,分析原因一方面与发酵后期发酵体系中水分减少,菌株生长状况受到影响有关;另一方面与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的产酶能力与木质素含量相关性不大有关,Kharayat Yogita 等^[18]的研究结果同样证明巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 产 LiP 酶的能力与发酵体系中木质素含量相关性不大。

在酶产量方面,本研究筛选到的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 产三种纤维素酶的能力基本一致且处于较低水平,进一步解释了巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 对纤维素的相对降解率偏低的试验现象。产木质素氧化酶的能力则差别较大,其产 Lac 酶的能力要明显优于产 MnP 酶和 LiP 酶的能力,而 Chen Yue hui 等^[19]的研究则证明新鞘氨醇杆菌 (*Novosphingobium*) 在降解木质素过程中 MnP 酶活性显著高于 Lac 酶活性。因此,筛选不同种属烤烟秸秆降解细菌有望为烤烟秸秆生物降解生产酶制品提供更多的利用途径。

细菌发酵作物秸秆生产酶制品作为一种生产周期短、便于规模化应用、产物稳定性好的秸秆利用方式,是一种较为有效的秸秆利用途径^[20]。本研究筛选到的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 被证明具有较好的利用烤烟秸秆产 Lac 酶的能力,其最大 Lac 酶活性较为接近现有研究水平^[21]。可作为今后细菌降解利用烤烟秸秆的研究方向之一,今后研究的重点将是酶产量的提高和酶产物的分离纯化。

致谢:本论文在完成过程中得到了中国科学院青岛生物能源与过程研究所张海波副研究员的悉心指导,试验材料和部分试验设施由中国农业科学院烟

草研究所的马兴华副研究员和王传吉同学提供, 特此提出感谢。

参考文献

- [1] Akpinar O, Erdogan K, Bakir U, Yilmaz L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43 (1) : 119-125.
- [2] Acda MN, Cabangon RJ. Termite resistance and physico-mechanical properties of particleboard using waste tobacco stalk and wood particles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85 : 354-358.
- [3] Piotrowska-Cyplik A, Olejnik A, Cyplik P, Dach J, Czarniecki Z. The kinetics of nicotine degradation, enzyme activities and genotoxic potential in the characterization of tobacco waste composting. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (21) : 5037-5044.
- [4] Ye XF, Liu HE, Meng Q, Chen SW, Hu ZJ, Sun SG, Ma JH, Yu XN. Comparison of chemical composition in stalks of different tobaccos. *Tobacco Science & Technology*, 2013, (10) : 76-79. (in Chinese)
叶协锋, 刘红恩, 孟琦, 陈树伟, 胡战军, 孙曙光, 马君红, 于晓娜. 不同类型烟秸秆化学组分分析. 烟草科技, 2013, (10) : 76-79.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] Zhang HB, Cao ML, Jiang XL, Zou HB, Wang C, Xu X, Xian M. *De-novo* synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. *BMC Biotechnology*, 2014, 14 (30) : 1-7.
- [7] MIDI Inc. Operating Manual of Sherlock Microbial Identification System. 1997: 37-58.
- [8] Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81 (8) : 2280-2284.
- [9] Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (8) : 2788-2793.
- [10] Klopman G, Tu MH, Fan BT. META 4. Prediction of the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Theoretical Chemistry Accounts*, 1999, 102 (1/6) : 33-38.
- [11] Beukes N, Pletschke BI. Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus* cellulosome-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264 (2) : 226-231.
- [12] 王瑞新, 韩富根, 杨素勤. 烟草化学品质分析法. 郑州: 河南科学技术出版社, 1999.
- [13] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74 (10) : 3583-3597.
- [14] Zhang N, Liu DY, Yang XM, Xu YC, Shen QR, Huang QW. Screening of thermophilic cellulose-decomposing fungi and their efficiency in decomposing tobacco stems. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30 (3) : 549-555. (in Chinese)
张楠, 刘东阳, 杨兴明, 徐阳春, 沈其荣, 黄启为. 分解纤维素的高温真菌筛选及其对烟杆的降解效果. 环境科学学报, 2010, 30 (3) : 549-555.
- [15] Yang XM, Liu YZ, Liu ZL, Lai YH, Chen YN. High yield laccase producing strains screened and the study of tobacco stem degradation affected by the strains. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30 (7) : 52-57. (in Chinese)
杨雪梅, 刘彦中, 刘志莲, 赖泳红, 陈勇能. 产漆酶菌株的筛选及其对烟秆降解效果的研究. 中国农学通报, 2014, 30 (7) : 52-57.
- [16] Li HY, Li SN, Wang SX, Wang Q, Zhu BC. Screening, identification of lignin-degradating *Bacillus* MN-8 and its characteristics in degradation of maize straw lignin. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47 (2) : 324-333. (in Chinese)
李红亚, 李术娜, 王树香, 王全, 朱宝成. 产芽孢木质素降解菌 MN-8 的筛选及其对木质素的降解. 中国农业科学, 2014, 47 (2) : 324-333.
- [17] Chang YC, Choi D, Takamizawa K, Kikuchi S. Isolation of *Bacillus* sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. *Bioresource Technology*, 2014, 152 : 429-436.
- [18] Kharayat Y, Thakur IS. Isolation of bacterial strain from sediment core of pulp and paper mill industries for production and purification of lignin peroxidase (LiP) enzyme. *Bioremediation Journal*, 2012, 16 (2) : 125-130.
- [19] Chen YH, Chai LY, Tang CJ, Yang ZH, Zheng Y, Shi Y, Zhang H. Kraft lignin biodegradation by *Novosphingobium* sp. B-7 and analysis of the degradation

process. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 682-685.

- [20] Kalia S, Thakur K, Kumar A, Celli A. Laccase-assisted surface functionalization of lignocellulosics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 102: 48-58.
- [21] Lončar N, Božić N, Lopez-Santin J, Vujčić Z. *Bacillus amyloliquefaciens* laccase-from soil bacteria to recombinant enzyme for wastewater decolorization. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 177-183.

Isolation of microorganisms producing enzyme capable of degrading tobacco straw and nicotine

Yulong Su^{1,2}, Qian Wang^{1,2}, Chengsheng Zhang^{1,2}, Jingang Gu³, Sujuan Shi^{1,4}, SM Nuruzzaman Manik^{1,2}, Jingjing Mao^{1,2}, Shigui Li³, Qiang Lei⁵, Renjun Wu⁵, Ying Yin⁵, Jiankang Qu⁵, Liang Li⁶, Haobao Liu^{1,2*}

¹ Key Laboratory of Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China

² Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

³ Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

⁴ College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China

⁵ Sichuan Tobacco Monopoly Administration, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

⁶ Yongde Suboffice of Yunnan Tobacco Company, Lincang 677600, Yunnan Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen tobacco straw and nicotine degrading microorganism. [Methods] The bacterium was isolated from tobacco field soil using medium containing tobacco straw as the sole carbon and nitrogen source. We identified the bacterium through morphological and physiological characterization combined with the result of 16S rRNA gene sequence and data analysis. We also studied the lignocelluloses degradation and enzyme activities related to the degradation of lignin and cellulose in liquid state fermentation of tobacco stalk. [Results] The bacterium was identified as *Bacillus megaterium* and we had demonstrated that it has a good ability to degrade lignin in tobacco straw when fermented in liquid state. It showed the highest laccase production of 418.52 U/L while the highest lignin peroxides and manganese peroxides activity was 19.71 U/L and 64.71 U/L. On the other hand, we also found that nicotine in tobacco stem was totally degraded 20 d after inoculation. [Conclusion] to the isolated *Bacillus megaterium* is capable of degrading tobacco straw partially and nicotine totally.

Keywords: *Bacillus megaterium*, nicotine degradation, tobacco straw degradation, laccase

(本文责编:李磊)

Supported by the Major Project of Sichuan Tobacco Monopoly Administration (201101006, 201202006) and the Central Public Welfare Special Fund for Basic Research Expenses of Research Institutes (2012ZL058)

* Corresponding author. E-mail: Liuhaobao@caas.cn

Received: 3 April 2015/Revised: 14 May 2015