



尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株的分离及其降解基因

梅枫, 孔雯, 李阳, 马婷婷, 皮婷, 何冬兰, 程国军, 刘涛, 李晓华*

中南民族大学生命科学学院, 生物技术国家民委重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要:【目的】分离并鉴定 1 株具有尼古丁降解能力的细菌, 研究其尼古丁降解特性并对其降解基因进行分析, 为尼古丁微生物降解提供基础。【方法】从烟草种植地土壤中分离 1 株具有尼古丁降解能力的细菌, 通过 16S rRNA 基因和生理生化特性对该菌株进行鉴定, 检测该菌株尼古丁降解率与生长量的关系, 并进一步对该菌株进行尼古丁浓度耐受性测定, 采用高通量测序技术对菌株进行全基因组测序, BLAST 比对分析尼古丁降解相关基因。【结果】筛选到 1 株具有尼古丁降解能力的细菌, 经鉴定命名为根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumerficiency*) SCUEC1 菌株, 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解率可达到 94.81%, 该菌株在尼古丁浓度为 0.50–5.00 g/L 范围内生长良好且有较高的尼古丁降解能力。对根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株全基因组序列进行 BLAST 比对分析, 推测该菌株的尼古丁降解代谢途径与中间苍白杆菌 SYJ1 菌株的尼古丁降解途径相似。【结论】本研究揭示了 *Agrobacterium tumerficiency* SCUEC1 菌株具备尼古丁降解特性, 初步推测出尼古丁降解相关基因和降解代谢途径, 为尼古丁微生物降解提供基础。

关键词: 尼古丁, 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株, 降解特性, 代谢途径

尼古丁(nicotine)是一个杂环复合物, 由一个吡啶和吡咯环组成, 结构稳定, 不易降解, 是烟草中的主要生物碱^[1-2]。尼古丁对人体有害, 很容易被人体吸收, 也是吸烟上瘾的主要物质, 而且能引起严重的心血管疾病、癌症、基因突变和畸形等^[3]。尼古丁作为神经毒素能够影响细胞的生命进程, 例如细胞凋亡、细胞的畸形生长、提高基

因表达率、分泌激素和调节酶的活性^[4-5]。当人体吸入香烟时, 肺部会快速吸收 90%的尼古丁^[6]。人体中的尼古丁能快速通过生物膜和血脑屏障, 并加快心率和升高动脉压, 引起静脉功能障碍^[7-9]。此外, 尼古丁易溶于水, 在烟草种植和香烟生产上很容易造成固体和液体的高浓度污染, 严重影响环境平衡和人类健康^[10]。欧洲联盟已将每千克

基金项目: 国家自然科学基金(31070087, 30570046); 湖北省自然科学基金重点项目(2011CDA079, 2008CDB076); 中央科研基本业务费(CZW16005, YCZW15104)

*通信作者。Tel: +86-27-67843541; Fax: +86-27-67842689; E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

收稿日期: 2016-10-04; 修回日期: 2016-11-16; 网络出版日期: 2016-12-28

尼古丁质量浓度超过 500 mg 的烟草废弃物规定为“有毒有害物”，因此，尼古丁降解成为迫切需要解决的问题，而利用微生物降解尼古丁是低成本高效率且对环境影响小的尼古丁降解方法^[11-12]。

利用微生物降解环境污染物是最有发展前景的方法^[13-16]。降解尼古丁的微生物主要有嗜烟碱节杆菌(*Arthrobacter nicotianaes*)^[17-19]、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[20-24]、中间苍白杆菌(*Ochrobactrum intermedium*)^[25]、土壤杆菌属(*Agrobacterium* sp.)^[26-27]、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[28]和米曲菌(*Aspergillus oryzae*)^[29]等，这些微生物利用尼古丁作为生长的唯一的碳源、氮源和能源^[30]。微生物降解尼古丁的途径因微生物菌种的不同而有所差异，节杆菌(*Arthrobacter* sp.)首先从吡啶环开始降解尼古丁(吡啶途径)，假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)首先从吡咯环开始降解尼古丁(吡咯途径)，真菌是去掉尼古丁吡咯环的甲基基团(去甲基化途径)。本研究从湖北省襄阳市烟草种植地土壤分离出 1 株具有较高的尼古丁降解能力的微生物，通过对其降解特性和尼古丁降解途径进行研究，为利用微生物降解尼古丁的应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 土壤样品

土壤样品采自湖北省襄樊市烟草种植基地。

1.2 培养基

尼古丁培养基(g/L)：K₂HPO₄ 13.30，KH₂PO₄ 4.00，(NH₄)₂SO₄ 0.01，酵母粉 1.00，10.00 mL 微量元素(MgSO₄·7H₂O 1.00 g，MnSO₄·H₂O 0.40 g，CaCl₂·2H₂O 0.20 g，CuCl₂·2H₂O 0.20 g，FeSO₄·7H₂O 0.02 g，用 0.10 mol/L HCl 溶解至 100 mL)，加蒸馏水定容至 1000 mL，自然 pH。加入 0.5 g 尼古丁。

尼古丁固体培养基：在尼古丁培养基中添加 1.8% 的琼脂粉。

1.3 尼古丁降解菌的分离

称取 2.00 g 土壤样品于 20.00 mL 尼古丁培养基，30 °C、180 r/min 摇床培养。用 0.90% 生理盐水梯度稀释，涂布于尼古丁分离培养基，于 30 °C 培养，挑取菌株划线分离纯化。分别将纯化的菌株接入尼古丁培养基中，于 30 °C、180 r/min 摇床培养，测定发酵液中尼古丁浓度。

1.4 尼古丁培养基中尼古丁浓度的测定

根据尼古丁在波长为 259 nm 处有吸收峰，采用紫外分光光度法测定尼古丁的含量。将菌株接入尼古丁培养基中，于 30 °C、180 r/min 摇床培养，用不接菌的尼古丁培养基作空白对照(CK)，发酵液在 12000 r/min 条件下离心 5 min，测定发酵液在紫外光波长为 259 nm 处的吸光值。

尼古丁降解率的计算公式为：尼古丁降解率=(原培养液中尼古丁浓度-发酵液中尼古丁浓度)/原培养液中尼古丁浓度×100%。

1.5 菌体生长量的测定

将菌株接种至尼古丁培养基中，在 30 °C、180 r/min 条件下摇床培养，定时取样，采用分光光度法测定菌体的生长量，菌体生长量用 OD₆₀₀ 表示。

1.6 菌种鉴定

参照文献[31]进行形态结构观察和生理生化特性鉴定。参照文献[32]提取细菌总 DNA，测定 16S rRNA 基因序列。用于 16S rRNA 基因的 PCR 反应的引物为 1 对通用引物，正向引物 F1：5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物 F2：5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'。PCR 反应体系(20.00 μL)：10×PCR 缓冲液 2.00 μL，dNTPs

1 μL , 正向引物 F1 和反向引物 F2 各 1.00 μL , 模板 DNA 1.00 μL , *Taq* 酶 0.25 μL , 超纯水 13.75 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。测序结果利用 BLAST 在 GenBank 基因库中进行同源性比较并进行鉴定。利用 MEGA 6 进行 16S rRNA 基因序列的比对与系统发育树的构建(采取 Neighbor-Joining 法, bootstrap value 为 1000)。

1.7 发酵液的 HPLC 检测

用 0.22 μm 的水相膜过滤发酵液, HPLC 检测, 检测条件为: 波长为 259 nm, 色谱柱为 C_{18} 柱 (4.60 mm \times 250.00 mm, 5.00 μm)。流动相为甲醇(色谱纯) 1.00 mmol/L $\text{H}_2\text{SO}_4=25:75$ 流速为 0.50 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20.00 μL 。

1.8 基因组 DNA 的提取、测序及分析

基因组 DNA 的提取采用 TaKaRa 基因组 DNA 提取试剂盒。基因组测序由上海人类基因组研究中心基因组测序部完成。采用 Velvet V1.2.03 对数据进行拼装, 通过结合软件 Glimmer 3.02 进行基因预测。搜寻 NCBI 的 nr 库, KEGG 蛋白数据库以及 SEED 蛋白数据库进行基因功能注释, 利用 CDD 数据库进行 COG 分类, 通过 KEGG 数据库构建代谢通路^[33]。将全基因组测序结果与已知降解基因的尼古丁降解菌的序列在 NCBI 中进行比对, 预测尼古丁降解相关基因, 推测可能的尼古丁降解途径。

2 结果和分析

2.1 尼古丁降解菌的分离

从湖北省襄阳市烟草种植地土壤样品中分离得到 1 株尼古丁降解菌株, 命名为 SCUEC1 菌株。将尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株以 5% 的接种量接

种到尼古丁浓度为 1.00 g/L 的培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床发酵 48 h, 用紫外分光光度计法测定发酵液中尼古丁含量, 结果如图 1 所示: 尼古丁培养基(CK)在 259 nm 处有吸收峰, 而尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株发酵 48 h 后 259 nm 处吸收峰消失, 表明尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株具有尼古丁降解能力。

2.2 尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株的鉴定

尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株显微观察和生理生化实验结果为: 在尼古丁固体培养基菌落呈淡黄色, 光滑凸起, 边缘整齐, 平板不变色, 液体发酵培养产生色素使原始澄清透明淡黄色培养液变成墨绿色; 革兰氏染色、伏-普试验、甲基红试验、吲哚试验、硫化氢试验和柠檬酸试验均呈阴性。

尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株的 16S rRNA 基因序列长度 1473 bp, 构建尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株系统发育树, 从图 2 可以看出: 该菌株与根癌土壤杆菌属 (*Agrobacterium tumerficiency*) 分支较近。结合生理生化特性, 初步确定尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株为根癌土壤杆菌属 (*Agrobacterium tumerficiency*)。该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心, 其保藏编号: CCTCC M 2014133。

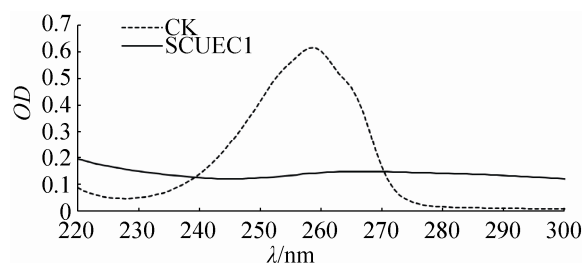


图 1. 尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株发酵液和尼古丁培养基紫外吸收图谱

Figure 1. UV absorptions spectrum of fermentation liquid by SCUEC1 strain and nicotine medium.

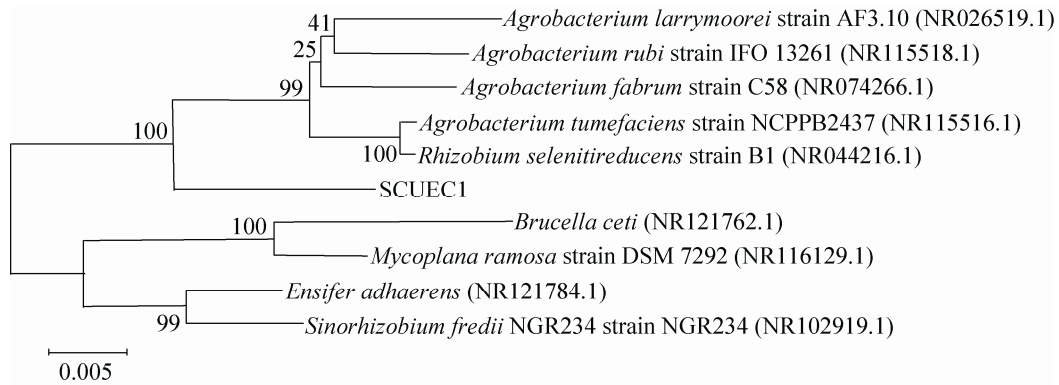


图 2. 尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of nicotine degradation SCUEC1 strain. The GenBank accession numbers are given in parentheses. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar 0.005 at the bottom is the sequence divergence.

2.3 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株的降解特性

2.3.1 尼古丁降解率与生长量的关系：将根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株以 5% 的接种量接种至尼古丁培养基中，尼古丁质量浓度为 1.00 g/L，30 °C、180 r/min 摇床培养，取样测定并计算发酵液的尼古丁质量浓度和菌体浓度。结果如图 3 所示，根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株 0–12 h 处于延滞期，12 h 后菌体的生长速度加快进入对数生长期，36 h 后处于平稳期，随着根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株的生长，尼古丁不断被降解，36 h 菌株生长量和尼古丁降解率都达到最大，此时发酵液中的尼古丁浓度由 0 h 的 3.16 g/L 降到了 0.53 g/L，菌体的 OD_{600} 值也由 0 h 的 0.04 增加到了 1.81。表明尼古丁降解率和菌体生长量呈正相关。

2.3.2 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株对尼古丁的耐受性：将根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株分别接种到尼古丁浓度分别为 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00 g/L 的尼古丁培养基中，30 °C、180 r/min 摇床培养，取样测定并计算发酵液的尼古丁浓度和菌体浓度。结果如表 1 所示，根癌土壤杆

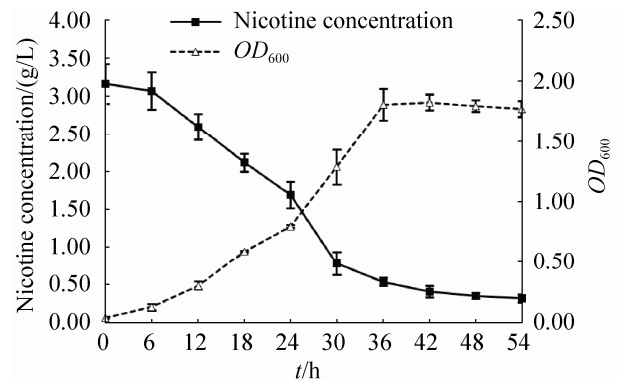


图 3. 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株的生长与尼古丁降解
Figure 3. The growth and degradation curve of *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 strain.

菌 SCUEC1 菌株在尼古丁浓度为 0.50–4.00 g/L 时，尼古丁降解率都在 85.66% 以上，菌体的 OD_{600} 值也都在 1.10 以上；当尼古丁浓度为 5.00 g/L 时，根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解率下降到 41.26%，菌体的 OD_{600} 值也下降到 0.88；当尼古丁浓度为 6.00 g/L 或高于 6.00 g/L 时，根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株生长量和降解率都较低，菌体的 OD_{600} 值低于 0.13，降解率低于 8.57%，表明根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株对尼古丁的耐受性浓度为 5.00 g/L。

表 1. 不同尼古丁浓度对根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解率和生长量的影响

Table 1. Effect of nicotine concentration on growth and degradation of SCUEC1 strain

Nicotine concentration/(g/L)	Growth amount/ OD_{600}	Degradation rate/%
0.50	1.06	93.22
1.00	1.18	94.81
2.00	1.26	89.26
3.00	1.28	87.27
4.00	1.10	85.66
5.00	0.88	41.26
6.00	0.13	8.57
7.00	0.06	6.53

2.4 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中间代谢产物 HPLC 分析

将根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株的静止细胞

(OD_{600} 为 0.60 左右)以 10%的接种量接种至 pH 7.0、尼古丁浓度为 1.00 g/L 的 0.05 mol/L K_2HPO_4/KH_2PO_4 缓冲液中, 30 °C、180 r/min 摇床培养 48 h, 分别定时取样, 发酵液 12000 r/min 离心 5 min, 用 0.22 μm 的水相膜过滤。进行 HPLC 检测。结果如图 4 显示, 液体培养基中尼古丁的保留时间在 6.50 min 左右。当培养到 11 h 时, 6.50 min 左右的尼古丁峰面积明显减少, 出现一个保留时间在 13.50 min 左右和 17.11 min 左右的新色谱峰, 表明培养基中的尼古丁被降解, 同时产生中间代谢产物。当培养到 24 h 时, 6.50 min 左右的尼古丁峰面积趋近于 0, 17.11 min 左右的新色谱峰面积增大, 表明根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株将尼古丁降解并产生中间代谢产物。

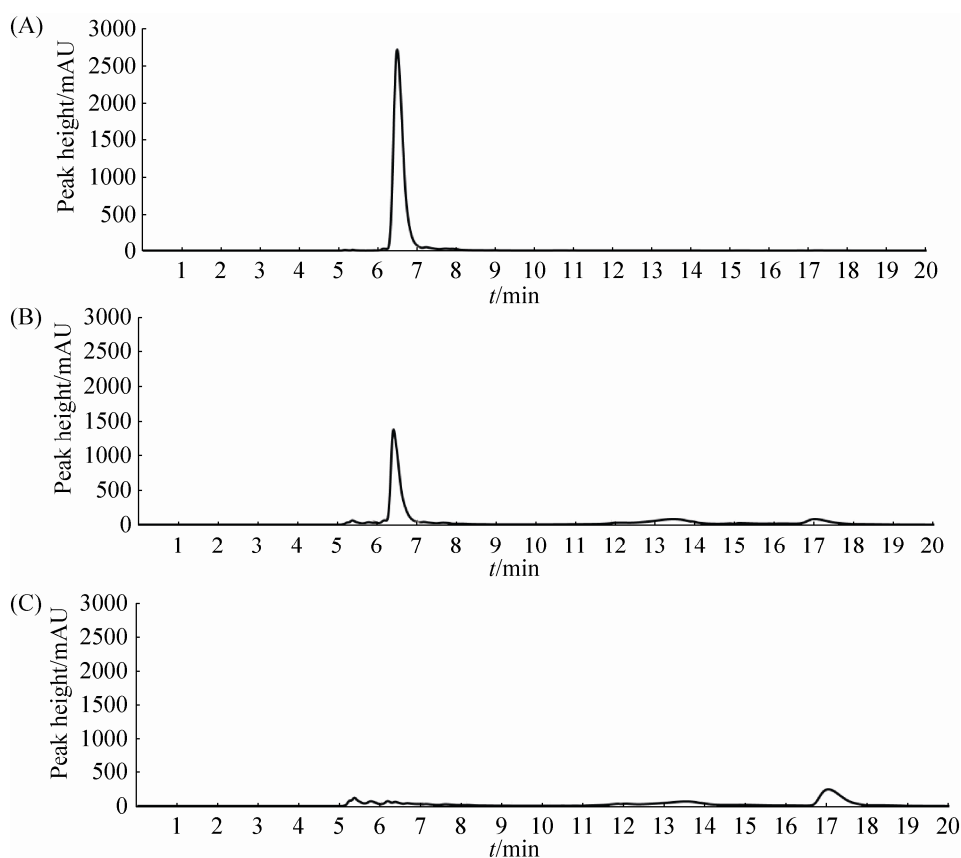


图 4. 不同培养时间尼古丁降解菌 SCUEC1 菌株发酵液 HPLC 分析

Figure 4. HPLC analysis of nicotine degradation SCUEC1 strain. A: 0 h; B: 11 h; C: 24 h.

2.5 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中尼古丁降解相关基因的分析

根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株进行全基因组测序,基因组组装获得 30 个 contigs,整个基因组大小约 5.32 Mb,编码区 GC 含量为 60.30%。CDS 数为 5039,平均 CDS 长度为 907 bp,tRNA 数量为 43。

与已知的尼古丁降解菌的序列比对分析发

现,根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株的尼古丁降解相关基因主要位于 contig18 和 contig25 上,与中间苍白杆菌 SYJ1 菌株的尼古丁降解相关基因同源性较高(表 2),中间苍白杆菌 SYJ1 菌株的尼古丁降解途径是吡咯途径与吡啶途径的变形途径^[34]。根据已报道的尼古丁降解基因簇推测根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株的尼古丁降解基因簇(图 5),并预测该菌株的尼古丁代谢途径(图 6)。

表 2. 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中尼古丁降解相关基因预测

Table 2. Gene involved in degradation of nicotine in *Agrobacterium tumerfificence* SCUEC1 strain

Genes	Contig No.	Position/nt	Protein homologue	Identity/%	Proposed function
<i>agnA</i>	Contig 18	29414–32127	VppA	100	Nicotine hydroxylase
<i>agnB</i>	Contig 18	32746–34059	VppB	99	6-hydroxy-nicotine oxidase gene
<i>agnD</i>	Contig 25	6912–8087	VppD	99	6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine 3-monooxygenase
<i>agnE</i>	Contig 18	38286–39314	VppE	99	2,5-dihydroxy-pyridine dioxygenase
<i>agnF</i>	Contig 18	37478–38260	VppF	99	N-formylmaleamic acid deformylase
<i>agnG</i>	Contig 18	39376–40008	VppG	99	Maleamate amidase
<i>agnH</i>	Contig 18	36881–37465	VppH	99	Maleate isomerase

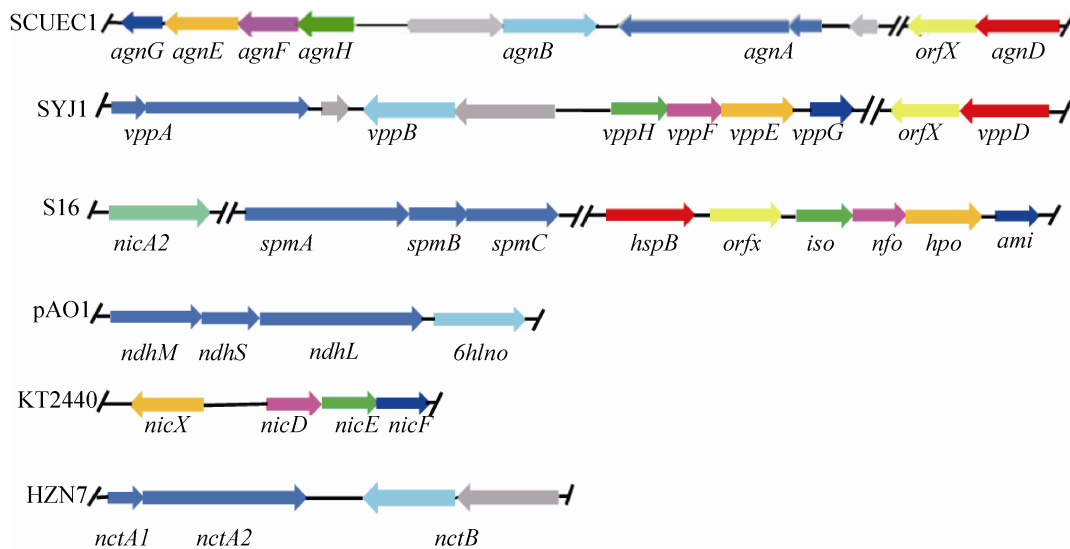


图 5. 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株中尼古丁降解基因簇的预测和已报道的尼古丁降解基因簇的比较

Figure 5. Gene cluster of nicotine degradation have been reported and proposed gene cluster of nicotine degradation in *Agrobacterium tumerfificence* SCUEC1 strain. SYJ1: *Ochrobactrum* sp. SJY1; S16: *Pseudomonas putida* S16; pAO1: *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1; KT2440: *Pseudomonas putida* KT2440; HZN7: *Shinella* sp. HZN7.

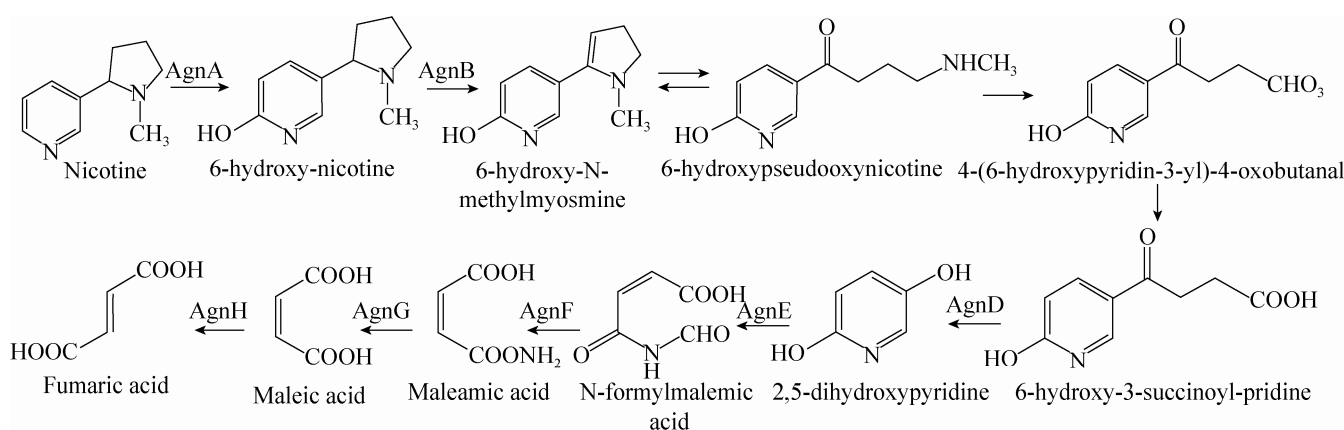


图 6. 根癌土壤杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解代谢途径的推测

Figure 6. Proposed pathway of nicotine catabolism in *Agrobacterium tumerficense* SCUEC1 strain.

3 讨论

本研究从湖北省襄阳市烟草种植地土壤中分离得到 1 株尼古丁降解菌, 鉴定为根癌土壤农杆菌(*Agrobacterium tumerficense*)。SCUEC1 菌株具有较高尼古丁耐受力 and 尼古丁降解率, 发现该菌株在尼古丁浓度 0.50–5.00 g/L 内生长良好且有较高的尼古丁降解能力。根据文献报道, *Ochrobactrum* sp. 4–40 尼古丁降解率为 51.50%^[35], *Sinorhizobium* sp. 5–28 尼古丁降解率为 72.50%^[36], *Pseudomonas plecoglossicida* 尼古丁降解率为 88.00%^[37], 根癌土壤农杆菌 SCUEC1 菌株尼古丁降解率为 94.81%, 具有较高的尼古丁降解率。全基因测序与比对分析表明, 该菌株具有尼古丁降解途径中重要酶类的编码基因, 如尼古丁羟化酶、6-羟基-尼古丁氧化酶、6-羟基-3-琥珀酰吡啶还原酶、2,5-二羟基吡啶双加氧酶、顺丁烯酰胺酸去酰胺酶、顺丁烯异构酶。

尼古丁降解微生物能将尼古丁转化为多种中间代谢产物, 其中的一些中间代谢产物能被用于制药工业。例如吡啶衍生物, 能被广泛用于抗癌治疗、镇痛药的发展、帕金森的治疗、缓解高血

压以及中央神经系统的紊乱。二羟基吡啶可用于合成植物生长调节剂、除草剂、治疗癌症的药物和类似于亚铁血红素和叶绿素的卟啉类化合物。6-羟基-3-琥珀酰吡啶是合成地棘蛙素类似物药物的前体物, 地棘蛙素是一种极其有效的止痛剂分子。全基因测序及分析为揭示新型尼古丁降解途径和调控机制提供可能, 本研究表明了 *Agrobacterium tumerficense* SCUEC1 菌株具有尼古丁降解性能, 其降解代谢途径已经被推测, 并从基因层面证实了该菌株具有尼古丁降解能力, 为尼古丁微生物降解的研究提供依据。

参考文献

- [1] Hawkins BT, Abbruscato TJ, Egleton RD, Brown RC, Huber JD, Campos CR, Davis TP. Nicotine increases *in vivo* blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Research*, 2004, 1027(1/2): 48–58.
- [2] Cogo K, Montan MF, de Cássia Bergamaschi C, Andrade ED, Rosalen PL, Groppo FC. *In vitro* evaluation of the effect of nicotine, cotinine, and caffeine on oral microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, 54(6): 501–508.
- [3] Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*, 2004, 43(6): 619–632.
- [4] Yildiz D, Ercal N, Armstrong DW. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology*, 1998, 130(2/3): 155–165.
- [5] Qiao D, Seidler FJ, Slotkin TA. Oxidative mechanisms

- contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 206(1): 17–26.
- [6] Zhang YD, Luo CR, Wang HL, Lu GF. Advances in microbial degradation of nicotine and its application. *Tobacco Science & Technology*, 2003, (12): 3–7. (in Chinese)
张彦东, 罗昌荣, 王辉龙, 卢国藩. 微生物降解烟碱研究应用进展. *烟草科技/烟草工艺*, 2003, (12): 3–7.
- [7] Campain JA. Nicotine: potentially a multifunctional carcinogen? *Toxicological Sciences*, 2004, 79(1): 1–3.
- [8] Schievelbein H. Nicotine, resorption and fate. *Pharmacology & Therapeutics*, 1982, 18(2): 233–247.
- [9] Sabha M, Tanus-Santos JE, Toledo JCY, Cittadino M, Rocha JC, Moreno H Jr. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 68(2): 167–174.
- [10] Zhong WH, Zhu CJ, Shu M, Sun KD, Zhao L, Wang C, Ye ZJ, Chen JM. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 6935–6941.
- [11] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, de Bertoldi M. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms. *Waste Management & Research*, 1997, 15(4): 349–358.
- [12] Brandsch R, Decker K. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*. *Archives of Microbiology*, 1984, 138(1): 15–17.
- [13] Bešković VP, Gojgić-Cvijović G, Milić J, Ilić M, Miletić S, Šolevića T, Vrvica MM. *Ex-situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil)—a field experiment. *Chemosphere*, 2011, 83(1): 34–40.
- [14] Langer U, Böhme L, Böhme F. Classification of soil microorganisms based on growth properties: a critical view of some commonly used terms. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2004, 167(3): 267–269.
- [15] Brenner K, You LC, Arnold FH. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(9): 483–489.
- [16] Eberhardt HJ. The biological degradation of nicotine by nicotinophilic microorganisms. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 1995, 16(3): 119–129.
- [17] Baitsch D, Sandu C, Brandsch R, Igloi GL. 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. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18): 5262–5267.
- [18] Igloi GL, Brandsch R. Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(6): 1976–1986.
- [19] Kong W, Xian F, Li CY, Wang JX, Li XH. Isolation and characterization of a high nicotine-degradation bacterium. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(1): 30–33. (in Chinese)
孔雯, 先锋, 李长影, 王家昕, 李晓华. 1 株烟碱降解菌的筛选、鉴定及其降解性能的初步研究. *华中农业大学学报*, 2011, 30(1): 30–33.
- [20] Ruan AD, Min H, Peng XH, Huang Z. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. *Research in Microbiology*, 2005, 156(5/6): 700–706.
- [21] Tang HZ, Wang LJ, Meng XZ, Ma LY, Wang SN, He XF, Wu G, Xu P. Novel nicotine oxidoreductase-encoding gene involved in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 772–778.
- [22] Tang HZ, Wang SN, Ma LY, Meng XZ, Deng ZX, Zhang DK, Ma CQ, Xu P. A novel gene, encoding 6-hydroxy-3-succinoylpyridine hydroxylase, involved in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1567–1574.
- [23] Wang LJ, Tang HZ, Yu H, Yao YX, Xu P. An unusual repressor controls the expression of a crucial nicotine-degrading gene cluster in *Pseudomonas putida* S16. *Molecular Microbiology*, 2014, 91(6): 1252–1269.
- [24] Wang SN, Liu Z, Tang HZ, Meng J, Xu P. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. *Microbiology*, 2007, 153(5): 1556–1565.
- [25] Yuan YJ, Lu ZX, Huang LJ, Bie XM, Lü FX, Li Y. Optimization of a medium for enhancing nicotine biodegradation by *Ochrobactrum intermedium* DN2. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(3): 691–697.
- [26] Wang SN, Huang HY, Xie KB, Xu P. Identification of nicotine biotransformation intermediates by *Agrobacterium tumefaciens* strain S33 suggests a novel nicotine degradation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(6): 1567–1578.
- [27] Wang SN, Liu Z, Xu P. Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain S33. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(3): 838–847.
- [28] Gong XW, Yang JK, Duan YQ, Dong JY, Zhe W, Wang L, Li QH, Zhang KQ. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing. *Research in Microbiology*, 2009, 160(3): 200–204.
- [29] Meng XJ, Lu LL, Gu GF, Xiao M. A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves. *Research in Microbiology*, 2010, 161(7): 626–633.
- [30] Li HJ, Li XM, Duan YQ, Zhang KQ, Yang JK. Biotransformation of nicotine by microorganism: the case of *Pseudomonas* spp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1): 11–17.
- [31] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [32] Kieser T, Bibb M J, Chater KF, Butter MJ, Hopwood DA, Bittner MJ, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* genetics: a laboratory manual. *Norwich: John Innes Foundation*, 2000.

- [33] Yang HL, Zhang ZB, Yan RM, Wang Y, Zhu D. Whole-genome sequencing and analysis of an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. PRh5 from Dongxiang wild rice. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 801–809. (in Chinese) 杨慧林, 张志斌, 颜日明, 汪涯, 朱笃. 东乡野生稻内生放线菌 *Streptomyces* sp. PRh5 的全基因组测序及序列分析. *微生物学通报*, 2015, 42(4): 801–809.
- [34] Yu H, Tang HZ, Zhu XY, Li YY, Xu P. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. strain SJY1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 272–281.
- [35] Ma GH, Lei LP, Xia ZY, Gong XW, Zhou W, Yang JK. Diversity and phylogenetic analyses of nicotine degrading bacteria isolated from tobacco plantation soils. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6: 6392–6398.
- [36] Chen C, Ma GH, Lei LP, Zhou W, Shen XJ, Yang JK. Isolation, Identification and Characteristics of Nicotine-degrading Bacterium Strain 5-28. *Tobacco Science & Technology*, 2012, 5(298): 74–78. (in Chinese) 陈晨, 麻广慧, 雷丽萍, 周薇, 沈兴家, 杨金奎. 尼古丁降解细菌 5-28 菌株的分离鉴定和降解特性. *烟草科技*, 2012, 5(298): 74–78.
- [37] Raman G, Mohan KN, Manohar V, Natarajan S. Biodegradation of nicotine by a novel nicotine-degrading bacterium, *Pseudomonas plecoglossicida* TND35 and its new biotransformation intermediates. *Biodegradation*, 2014, 25: 95–107.

Isolation and gene characterization of a nicotine-degradation strain *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1

Feng Mei, Wen Kong, Yang Li, Tingting Ma, Ting Pi, Donglan He, Guojun Cheng, Tao Liu, Xiaohua Li*

Key Laboratory for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to identify bacterial species capable of degrading nicotine, and to characterize related genes. [Methods] One bacterial strain with the ability to degrade nicotine was screened from tobacco field soil by using nicotine as the sole carbon source. Using phylogenetic analysis of its 16S rRNA gene, together with physiological and biochemical characteristics, we identified this strain as *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1. We determined its association of degradation rate with its growth rate, and its tolerance to nicotine. Also, the genome was sequenced using high throughput sequencing technology, and the nicotine metabolic pathway of SCUEC1 strain was analyzed by bioinformatics tools. [Results] Nicotine degradation rate of SCUEC1 reached 94.81%. The strain tolerated nicotine with the concentration from 0.50 g/L to 5.00 g/L. Its metabolic pathway of nicotine degradation appeared similar to that of *Ochrobactrum* sp. strain SJY1. [Conclusion] *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 degraded nicotine. These findings provide a theoretical basis for biodegradation of nicotine.

Keywords: nicotine, *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1, degradation characteristic, metabolic pathways

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070087, 30570046), by the Natural Science Foundation of Hubei Province (2011CDA079, 2008CDB076) and by the Central Science Research Study Basic Expenses (CZW16005, YCZW15104)

*Corresponding author. Tel: +86-27-67843541; Fax: +86-27-67842689; E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

Received: 4 October 2016; Revised: 16 November 2016; Published online: 28 December 2016