

一株降解烟碱菌株 Pu17 的鉴定及其降解特性分析

李佳颖¹, 郭文龙¹, 邓征宇¹, 丁建冰¹, 刘峰¹,
李小慧¹, 袁芳¹, 黄应群¹, 李昂², 张舒昊², 金丰良^{2*}

(1. 湖南省烟草公司永州市公司, 湖南永州 425000; 2. 华南农业大学植物保护学院/绿色农药全国重点实验室, 广州 510642)

摘要: 烟碱含量的高低是烟草质量控制的一个重要指标, 如何降低这些烟叶中的烟碱含量是一个现实问题。微生物降解烟碱具有成本低和生态相容性好优点, 但是目前烟碱降解菌应用于烟草生产中报道很少。基于此, 本研究从湖南烟草种植地分离纯化一株菌, 形态学结合扫描电镜表明该菌为杆状细菌, 16S rRNA 测序为产脲节杆菌 *Paenarthrobacter ureafaciens*, 命名为 Pu17。酶活测定表明 Pu17 产蛋白酶, 不产淀粉酶、纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶; ELISA 分析了 Pu17 的降解特性, Pu17 适宜生长烟碱浓度为 2.0 g/L, 适宜生长温度为 30°C, 适宜生长 pH 为 6; 利用 Slogistic 模型对 Pu17 在烟碱浓度为 2 g/L 的纯烟碱培养基和 LB 培养基中的生长分析, 0.1%、1.0%和 2.0%接种量对应的生长延滞期分别为 27.91、12.16 和 11.68 h, 在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 中 1.0%和 2.0%接种量对应的生长延滞期分别为 2.11 和 0.36 h。高效液相色谱 (HPLC) 分析表明, Pu17 能以烟碱为唯一碳氮源生长, 在烟碱浓度为 2.0 g/L 培养基中培养 48 h, Pu17 降解烟碱达到 92.75%; 而在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 液体培养基中, 60 h 达到最大降解率为 90.57%。大田喷施 Pu17 可以显著降解烟叶中的烟碱含量, Pu17 在喷施后 24 h 时达到极显著差异水平 ($P < 0.0001$); 60 h 也达到差异显著水平 ($P = 0.0175$)。本研究筛选获得了降解烟草烟碱的产脲节杆菌并明确了其降解特性, 为烟草烟碱的降解提供了微生物资源, 并为环境保护提供了新思路。

关键词: 烟碱; 降解; Pu17 菌株; 耐受性

中图分类号: Q963

文献标识码: A

基金项目: 永州市烟草公司科技项目计划 (2023) 16 号“提高广东中烟仁和基地单元烟叶工业可用性配套技术研究与应用”, 国家自然科学基金 (32172498, 31972345)

作者简介: 李佳颖, 女, 1985 年生, 湖南衡阳, 农艺师, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: 13467486760@139.com

*通讯作者 Author for correspondence: 金丰良, 男, 博士, 教授, 基因工程与生物防治, E-mail: jflbang@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-12-07; 接受日期 Accepted: 2024-05-11

Identification and degradation characteristics of a nicotine-degrading strain Pu17

LI Jia-Ying¹, GUO Weng-Long¹, DENG Zheng-Yu¹, DING Jian-Bin¹, LIU Feng¹, LI Xiao-Hui¹, YUAN Fang¹, HUANG Ying-Qun¹, LI Ang², ZHANG Shu-Hao², JIN Feng-Liang^{2*} (1. Hunan Tobacco Company Yongzhou Company, Yongzhou 425000, Hunan Province, China; 2. National Key Laboratory of Green Pesticide, College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The level of nicotine content is an important index of tobacco quality control, and how to reduce the content of nicotine in these tobacco leaves is a practical problem. Microbial degradation of nicotine has the advantages of low cost and good ecological compatibility, but there are few reports on the application of nicotine-degrading bacteria in tobacco production. Based on this, this study isolated and purified a strain from tobacco growing field in Hunan Province. Morphology combined with scanning electron microscopy showed that the strain was rod-shaped bacteria, 16S rRNA sequencing was *Paenarthrobacter ureafaciens*, named Pu17. Enzyme activity assay showed that Pu17 produced protease, but not amylase, cellulase and β -glucosidase. The degradation characteristics of Pu17 were analyzed by ELISA. The optimum growth rate of Pu17 was 2.0 g/L, the optimum growth temperature was 30°C, the optimum culture time was 48 h, and the optimum growth pH was 6. The Slogistic model was used to compare the growth of Pu17 in pure nicotinic medium and LB medium with a nicotine concentration of 2 g/L. The lag time in growth nicotinic medium with 0.1%, 1.0% and 2.0% inoculations was 27.91, 12.16 and 11.68 h, respectively. In LB with a nicotine concentration of 2.0 g/L, the growth delays corresponding to 1.0% and 2.0% inoculations were 2.11 and 0.36 h, respectively. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that Pu17 could grow with nicotine as the only nitrogen source, and cultured in the medium with nicotine concentration of 2.0 g/L for 48 h, Pu17 degraded nicotine up to 92.75%. In LB liquid medium with nicotine concentration of 2.0 g/L, the maximum degradation rate was 90.57% at 60 h. The nicotine content in tobacco leaves was significantly degraded by spraying Pu17 in the field, and Pu17 reached a significant difference level at 24 h after spraying ($P < 0.0001$). The difference was also significant at 60 h ($P=0.0175$). In this study, *P. ureafaciens* was screened to degrade tobacco nicotine and its degradation characteristics were defined, which provided microbial resources for the degradation of tobacco nicotine and provided a new idea for environmental protection.

Key words: Nicotine; degradation; strain Pu17; tolerance

烟草是我国一种重要的栽培经济农作物，能分泌多种生物碱，包括烟碱、降烟碱、新烟碱和假木贼碱，烟碱约占总生物碱的 94%以上 (Passananti *et al.*, 2014)。烟碱 (Nicotine) 具有独特的作用，烟碱协助烟草抵御各种害虫的入侵，也是烟草质量评价

的重要指标。一般来讲，烟碱含量高的烟叶，烟气劲头越大，反之越小。因此，烟气中必须含有一定量的烟碱，但是烟碱含量也不能过高，否则会增加烟气的刺激性，影响卷烟吸味（Brown *et al.*, 1972; 张豪洋等, 2021）。目前尽管我国烟叶外观质量已接近国际水平，但是突出的问题就是烟碱含量偏高。美国烤烟的烟碱含量在 1.5%~3.5% 之间，白肋烟的烟碱含量约 2.9%。我国上部烤烟烟碱含量达为 3%~4%，白肋烟烟碱含量高达 6.0%（Passananti *et al.*, 2014）。烟叶中烟碱含量的阈值在 2.0% 左右，此时烟叶的内在化学成分最佳，品质最好（Wei *et al.*, 2014; Valentine *et al.*, 2018）。我国每年因为烟叶中烟碱含量太高而造成大量烟叶内积，既浪费了资源，又给烟草行业造成很大经济损失（Brown *et al.*, 1972; 万虎等, 2009; Passananti *et al.*, 2014）。降低烟叶的烟碱含量是我国烟草行业亟待解决的问题之一。对推动我国烟草行业绿色、低碳和可持续发展具有重要意义。

利用微生物来处理烟叶，既可以提高烟叶资源的利用率，降低卷烟烟碱含量，提高对人类的安全性，又可以减少烟碱对环境的污染。开展这方面的研究具有显著的经济效益和社会效益。获得国内外很多学者的关注。到目前为止，微生物烟碱降解菌被陆续分离，主要包括细菌、真菌和放射菌。细菌主要有（1）假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.; （2）节杆菌属 *Arthrobacter* sp.; （3）农杆菌属 *Agrobacterium* sp.; （4）红球菌属 *Rhodococcus* sp.; （5）申氏杆菌属 *Shinella* sp.; （6）不动杆菌属 *Acinetobacter* sp.; （7）鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* sp.; （8）极小单胞菌属 *Pusillimonas* sp.; （9）类诺卡氏菌属 *Nocardioides* sp.; （10）苍白杆菌属 *Ochrobactrum* sp.（Wang *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2014; Valentine *et al.*, 2018）。早在 1955 年，Frankenburg 等（1955）从烟草种子表面分离获得降解烟碱的微生物；Brown 等（1984）分离获得假单胞杆菌，并对烟草中的烟碱进行降解。处理 18 h 后，烟碱含量平均从 2.00% 降到了 0.85%，每支卷烟的烟碱含量从 1.58 mg 降到了 0.98 mg。国内学者也陆续报道，大部分只报道了菌株的分离、鉴定和室内降解效果。李雪梅等（2005）分离 *Bacillus* sp. X6 菌株，培养 36 h 将烟碱含量为 6.04 mg/g 烟草物料中的烟碱降解 60.3%，72 h 降解率为 87.6%；李颖等（2006）从烟区的土壤中分离获得降解菌中间苍白杆菌；Wang 等（2009）获得农杆菌 *Agrobacterium* sp. strain S33；张娟等（2012）和阮爱东等（2015）分离到假单胞菌，它们拥有较高降解烟碱能力。因此，为了获得新的高效烟碱降解菌种质资源、研究其降解特性，阐明其代谢途径对于降低烟草上部烟叶烟碱含量具有重要的意义。本研究从湖南省永州市烟草生产技术中心烟草地筛选后获得优良降解烟碱菌株 Pu17，因此，并对其分类地位进行鉴定，探究其烟碱降解特性，阐述其对不同培养基中烟碱的降解效率和对烟草植株的烟碱降解能力。旨在为微生物资源的开发与应用提供技术指导。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

土壤样品采自湖南省永州市烟草生产技术中心，所有采集样品均放入无菌自封袋中带回实验室于 4℃保存备用。烟碱降解菌的筛选按照彭琛等人的方法进行（彭琛等，2023）

1.2 Pu17 形态的电镜观察和分子生物学鉴定

挑取纯化后的单菌落接种于 LB 液体培养基中，30℃ 150 rpm，振荡培养到指数生长期。12 000 g 离心 30 min，收集菌体。菌体用磷酸缓冲液反复洗涤，将收集到的菌体加入 2.5%的戊二醛溶液，4℃下保存固定，固定后用 PBS 洗涤 3 次，后面继续用乙醇和醋酸异戊酯脱水、置换，最后经冷冻真空干燥后，喷金制样（苏丹等，2021），利用扫描电子显微镜对菌体形态观察。

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（北京天根生物科技有限公司），抽提 Pu17 菌的基因组 DNA，16S rDNA 通用引物 27F（5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'）和 1492R（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）PCR 扩增细菌的 16 S rDNA 序列，采用琼脂糖电泳对 PCR 产物进行检测，切胶回收送至擎科生物技术公司进行测序。利用 SeqMan 软件对测序结果进行拼接，并在 NCBI 上进行 Blast 比对，选取亲缘关系较近的菌株序列，用软件 MEGA 11.0，以 Neighbour-Joining 法构建系统发育树，调整 bootstrap 值并检验进化树的可靠性。

1.3 Pu17 菌株的酶活测定

将 Pu17 单菌落接种到 LB 液体培养基中，在 150 rpm、30℃的恒温振荡培养箱中培养至指数生长期作为种子液，取 0.7 μL 菌液点接在七叶苷培养基、纤维素刚果红培养基、蛋白质培养基以及淀粉培养基中，培养 72 h 后检测其产β-葡萄糖苷酶、纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶活性。

1.4 Pu17 菌株的降解特性分析

配置烟碱浓度为 0.01、0.02、0.05、0.10 和 0.20 g/L 的烟碱溶液，用分光光度计测定在 259 nm 波长下的吸光度值，并绘制标准曲线。

将 0.1%的种子液接种不同烟碱浓度（0、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 g/L）的液体培养基，150 rpm、30℃下恒温培养 12、24 和 48 h。用酶标仪（ELISA）测定其在 600 nm 处的数值（即 OD₆₀₀），每个处理 3 组重复，测定 Pu17 对不同浓度烟碱的耐受性。

分别在烟碱浓度为 2 g/L 的液体烟碱培养基中接种 0.1%的 Pu17 种子液，分别放置在不同温度（20、25、30、33、37℃）摇床中，150 rpm，培养 48 h 后，ELISA 分别测定 OD₆₀₀ 值。

配置 pH 梯度（5、6、7、8、9）的 LB 液体培养基。将 0.1% 的 Pu17 种子液接种到 LB 液体培养基，30℃培养 10 h 后，利用 ELISA 测定 OD₆₀₀ 值。

配置 pH 梯度（5、6、7、8、9）的液体烟碱培养基（烟碱浓度 2 g/L），分别接种 0.1% 的 Pu17 菌种子液，30℃振荡培养箱 150 rpm 培养 48 h 后，利用 ELISA 测定 OD₆₀₀ 值，使用 0.22 μm 滤膜进行过滤，将溶液用 0.05 mol/L 盐酸稀释 10 倍后采用分光光度计测定波长 259 nm 的吸光度值，设置 3 个生物学重复。

1.5 菌株 Pu17 生长曲线动力学研究

取单菌落 Pu17 接种到 LB 液体培养基中，在 150 rpm、30℃的恒温振荡器中过夜培养作为种子液。将 Pu17 种子液分别以 0.1%、1.0% 和 2.0% 转接到液体烟碱培养基（2.0 g/L），将 Pu17 种子液分别以 1.0% 和 2.0% 的接种到 LB 液体培养基中。将接种好的烟碱培养基和 LB 液体培养基放入至 150 rpm、30℃的恒温振荡器中培养，每隔 6 h 取样，用酶标仪测定 OD₆₀₀ 值。利用 Slogistic 模型对 Pu17 进行生长曲线动力学拟合（Gibson *et al.*, 1987）。

$$\lg(N_x/N_0) = a/\{1 + \exp[-k \times (x - T_c)]\} \quad (1)$$

$$\lambda = T_c - 2/K \quad (2)$$

式中：x 为时间；N_x 和 N₀ 为在 x 时和初始时间的微生物数量；a 为最大菌数 N_{max} 与初始菌数 N₀ 的差值；T_c 为达到最大生长速率的时间；K 为在时间点 T_c 的最大生长速率；λ 为生物生长的延滞期。

1.6 Pu17 对烟碱的降解能力测定

利用 HPLC 测定 LB 培养基和烟碱培养基中的烟碱含量。HPLC 标准曲线制作，制作参考专利（彭琛等，2023）。Pu17 对烟碱浓度为 2.0 g/L 的烟碱培养基中及 LB 培养基烟碱降解测定，方法参考 Alhazmi（2023）稍作改进。

1.7 Pu17 对烟草植株上烟碱的降解速度

按照正常规范化管理烟田进行试验，打顶期（移栽后 69 d）。随机选用 667 m² 打顶期的烟草（云烟 87）。在 150 rpm、30℃的恒温培养箱中培养 Pu17 菌液于指数生长期用于喷施，将 1 L Pu17 菌液稀释到 15 L 水中，混匀后，对云烟 87 上中部叶片进行喷施；对照组烟草喷施清水。菌液喷施后，分别在 0、24、36、48 和 60 h 随机收集烟草植株从上往下数第五片叶，同时也收集对照烟草植株第五片叶。将收集到的烟草称取鲜重，后放入烘箱将其完全烘干，后称取干重，将称重后的烟叶研磨并用 60 目筛过滤。将 0.1 g 的烟粉末与 0.2 g 活性炭混匀放入至 150 mL 锥形瓶中并向其中加入 25 mL 0.5 mol/L 的盐酸，加热至沸腾后在持续加入 5 min，倒入 250 mL 容量瓶中定容，过滤，取 30 mL 流出液，紫外分光光度计测定在 236、259 和 282 nm 处的吸光值。烟叶中的烟碱收集详细方法参考专利中的方法（彭琛等，2023），烟碱的含量测定参考苏玉龙（2016）方法稍作改进。

2 结果与分析

2.1 Pu17 形态学的鉴定

Pu17 在烟碱浓度为 2.0 g/L 的烟碱培养基上生长, Pu17 在 LB 平板上颜色为白色, 菌落呈圆形, 菌体湿润黏着度高(图 1-A)。革兰氏染色后细菌呈现紫色, 表明为 Pu17 属于革兰氏阳性菌(图 1-B)(Fernandes *et al.*, 2021)。通过扫描电子显微镜对 Pu17 进行观察, 结果表明该菌是一种杆状细菌(图 1-C)。

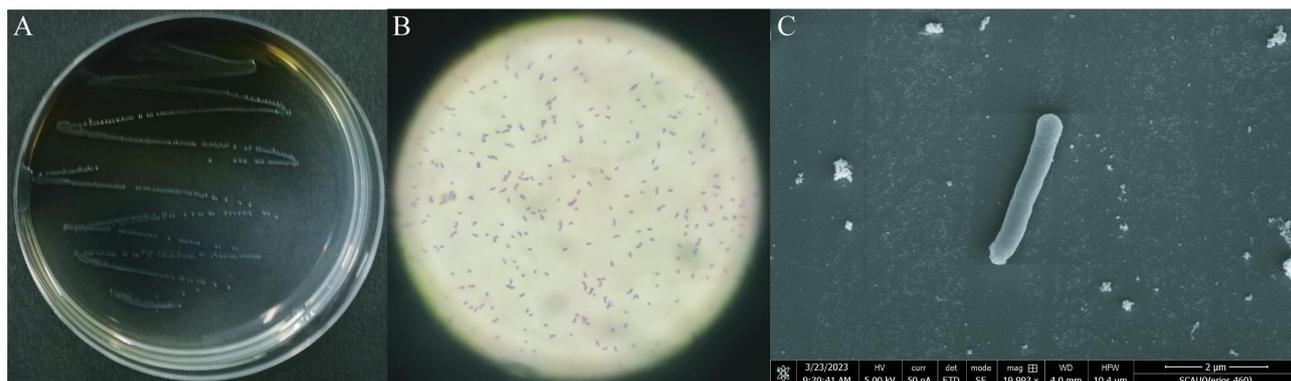


图 1 Pu17 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the bacterium Pu17

注: A, 在烟碱固体培养基上培养 Pu17 的形态特征; B, 光学显微镜; C, 扫描电子显微镜。Note: A, Morphological characteristics of Pu17 cultured on nicotinic solid medium; B, Observed under optical microscope; C, Observed under Scanning electron microscope.

2.2 基于 16S rRNA 基因的 Pu17 系统发育

利用 PCR 扩增获得 16S rDNA, DNA 凝胶电泳结果显示 Pu17 的 16S rDNA 序列大约为 1 400 bp, 测序结果确定序列全长 1 365 bp。系统进化树分析(图 2)表明 Pu17 与产脲节杆菌 *Paenarthrobacter ureafaciens* (MH234566.1) 序列一致性最高, 相似度达 99.56%, 因此将其命名为菌株 Pu17。

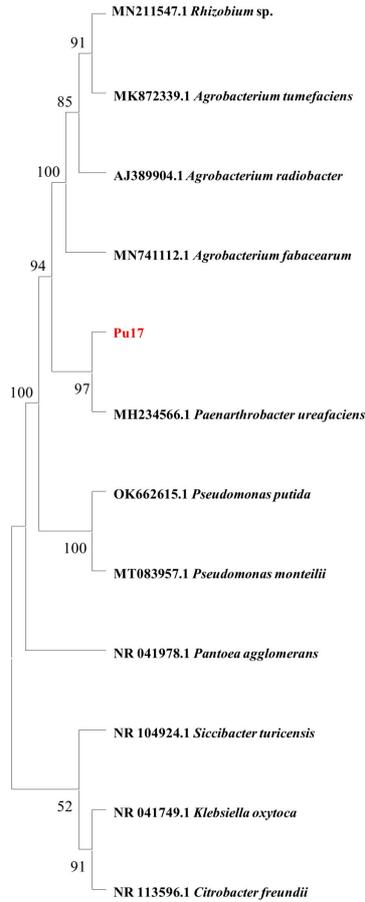


图 2 基于 16S rRNA Pu17 序列与其他相近菌种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA of Pu17 sequence with other related strains

2.3 Pu17 菌株的酶活特性

通过对菌株 Pu17 进行 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶活性检测，结果见图 3 所示。Pu17 在七叶苷上不显黑，在刚果红平板以及淀粉平板上不出现透明圈，在蛋白平板上出现透明圈，说明菌株 Pu17 产蛋白酶，不产 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶以及淀粉酶。

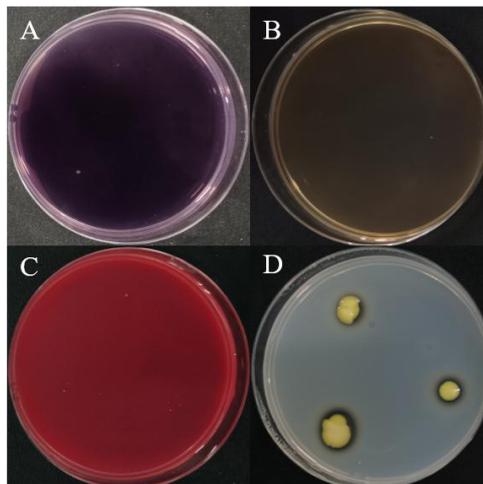


图3 Pu17菌株对4种酶的降解特性

Fig. 3 Degradation characteristics of four enzymes by Pu17 strain

注：A，淀粉酶酶活测定；B，β-葡萄糖苷酶酶活测定；C，纤维素酶酶活测定；D，蛋白酶酶活测定。Note: A, Determination of amylase activity; B, β-glucosidase enzyme activity determination; C, Determination of cellulase activity; D, Determination of protease enzyme activity.

2.4 Pu17降解烟碱的特性

Pu17对于烟碱有较强的耐受性，在烟碱浓度为0.1 g/L至8.0 g/L之间都可以正常生长（图4-A）。Pu17培养12、24和48 h内，Pu17适宜生长烟碱浓度为2.0 g/L；Pu17菌株在不同温度下在烟碱浓度为2 g/L的烟碱培养基中生长情况（图4-B），其中30℃下，培养48 h，Pu17生长最佳。菌株Pu17在烟碱浓度为2.0 g/L的烟碱培养基中，48 h不同pH值下烟碱降解和菌体的生长速度检测结果（图4-D）。Pu17菌在pH为5~8条件下都可以生长，在中性偏弱酸生长最快，Pu17最适合pH值为6，最高烟碱降解率为92.50%（图4-D）。说明Pu17菌对烟碱浓度为2.0 g/L的烟碱培养基中可以有效降解烟碱。

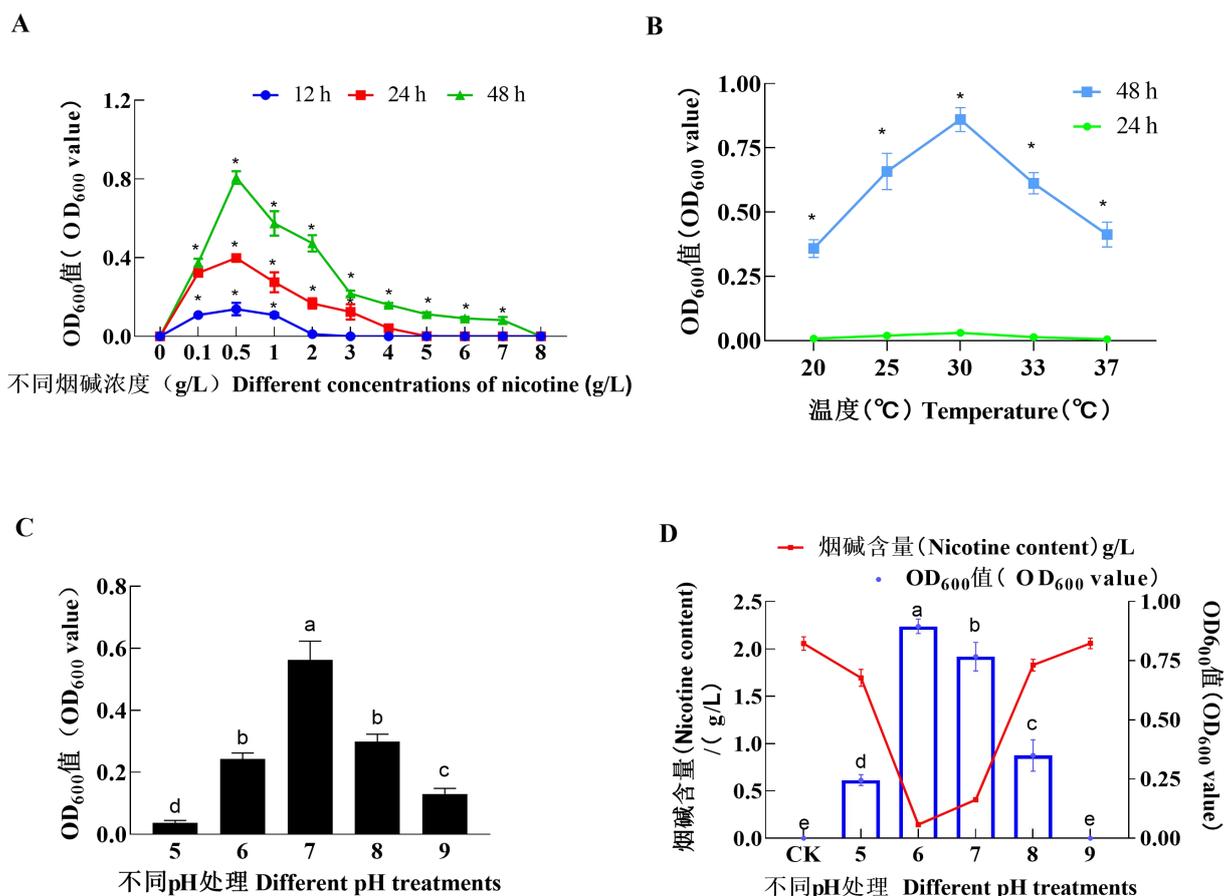


图4 Pu17菌株降解烟碱的特性

Fig. 4 Degradation characteristics of Pu17 strain

注：A，Pu17 对于不同浓度烟碱的耐受性；B，Pu17 菌在不同温度下的生长速率；C，Pu17 对不同 pH 的耐受性；D，Pu17 对 2 g/L 的烟碱降解速率。图中数值为平均值±标准误（n=3），柱上不同字母和星号表示不同处理达到差异显著（ $P < 0.05$ ，方差分析中的 LSD 和 Duncan 检验）。Note: A, Tolerance of Pu17 to different concentrations of nicotine; B, Growth rate of Pu17 at different temperatures; C, Tolerance of Pu17 to different pH in pure LB; D, Degradation of nicotine by Pu17. Values in the figure were the mean±SE (n=3), and different letters or asterisk above each bar indicated a significant difference ($P < 0.05$, LSD and Duncan in ANOVA).

2.5 菌株生长曲线动力学研究

将 Pu17 菌株分别以 0.1%、1.0%、2.0% 接种量接种至烟碱浓度为 2.0 g/L 的纯烟碱培养基中，采用 matlab 软件对 Pu17 菌株的生长曲线进行拟合，结果如表 1 所示。菌株 Pu17 在烟碱培养基中的生长速率曲线如图 5-A 和图 5-B 所示。Pu17 菌株以极低的接种量（0.1%）接种在烟碱浓度为 2.0 g/L 的纯烟碱培养基中可以正常生长繁殖，且 Pu17 菌株的生长规律符合逻辑斯蒂生长曲线，将 Pu17 菌株以接种量 0.1%、1.0%、2.0% 接种至烟碱浓度为 2.0 g/L 的纯烟碱培养基中，Pu17 菌株生长延滞期 λ 分别为 27.91、12.16 和 11.68 h。随着接种量的增加，Pu17 在 2.0 g/L 的烟碱培养基中的生长延滞期逐渐缩短。

将 Pu17 菌株分别以 1.0% 和 2.0% 接种量接种至烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中，采用 matlab 软件对 Pu17 菌株的生长曲线进行拟合，结果如表 2 所示。Pu17 菌株以 1.0% 和 2.0% 接种量接种至烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中，Pu17 菌株的生长规律符合逻辑斯蒂生长曲线，延滞期 λ 分别为 2.11 和 0.36 h。如图 5-C 和 5-D 所示，Pu17 菌株在 2.0 g/L 的 LB 培养基中的生长延滞期极短，且随着接种量增大呈缩短趋势。通过延滞期对比，Pu17 菌株在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中的生长速率快于在纯烟碱培养基中的生长速率（表 1 和表 2）。

表 1 逻辑斯蒂生长曲线拟合
Table 1 Logistic growth curve fitting

接种量 (%)	拟合曲线	拟合度 (R^2)	延滞期 (h)
Inoculum size	Fitted curve	R-Squared	Lag phase
0.1	$f(x) = \frac{1.046}{1 + \exp(-0.1702 \times (x - 39.66))}$	0.999	27.91
1.0	$f(x) = \frac{1.069}{1 + \exp(-0.1316 \times (x - 27.36))}$	0.987	12.16
2.0	$f(x) = \frac{1.015}{1 + \exp(-0.1589 \times (x - 24.47))}$	0.965	11.68

表 2 逻辑斯蒂生长曲线拟合
Table 2 Logistic growth curve fitting

接种量 (%)	拟合曲线	拟合度 (R ²)	延滞期 (h)
Inoculum size	Fitted curve	R-Squared	Lag phase
1.0	$f(x) = \frac{1.606}{1 + \exp(-0.1166 \times (x - 19.26))}$	0.973	2.11
2.0	$f(x) = \frac{1.588}{1 + \exp(-0.1239 \times (x - 12.53))}$	0.959	0.36

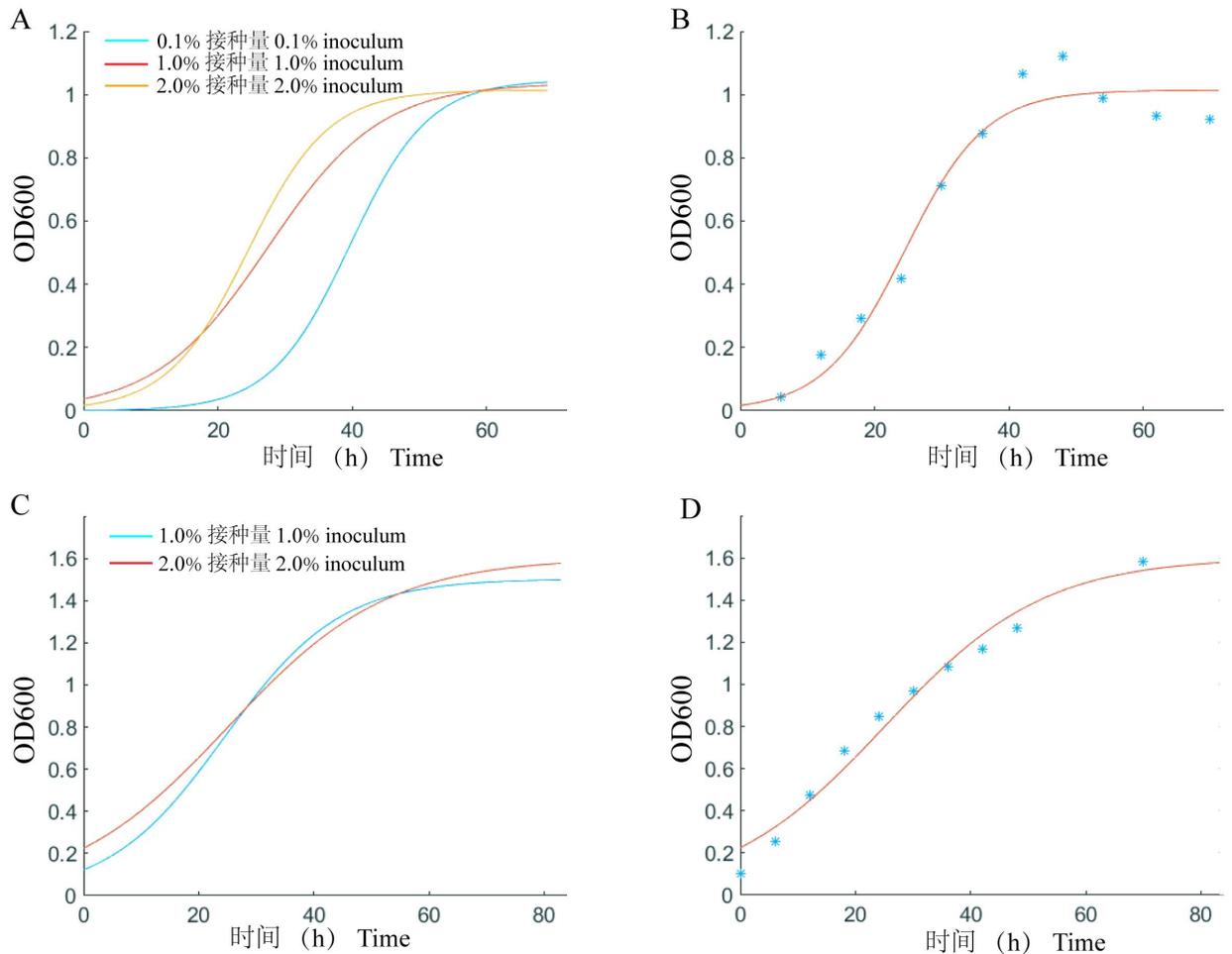


图5 Pu17 不同接种量在烟碱浓度为 2.0 g/L 的培养基中的生长拟合曲线

Fig. 5 Growth fitting curves of Pu17 inoculated at different doses in medium with nicotine concentration of 2.0 g/L

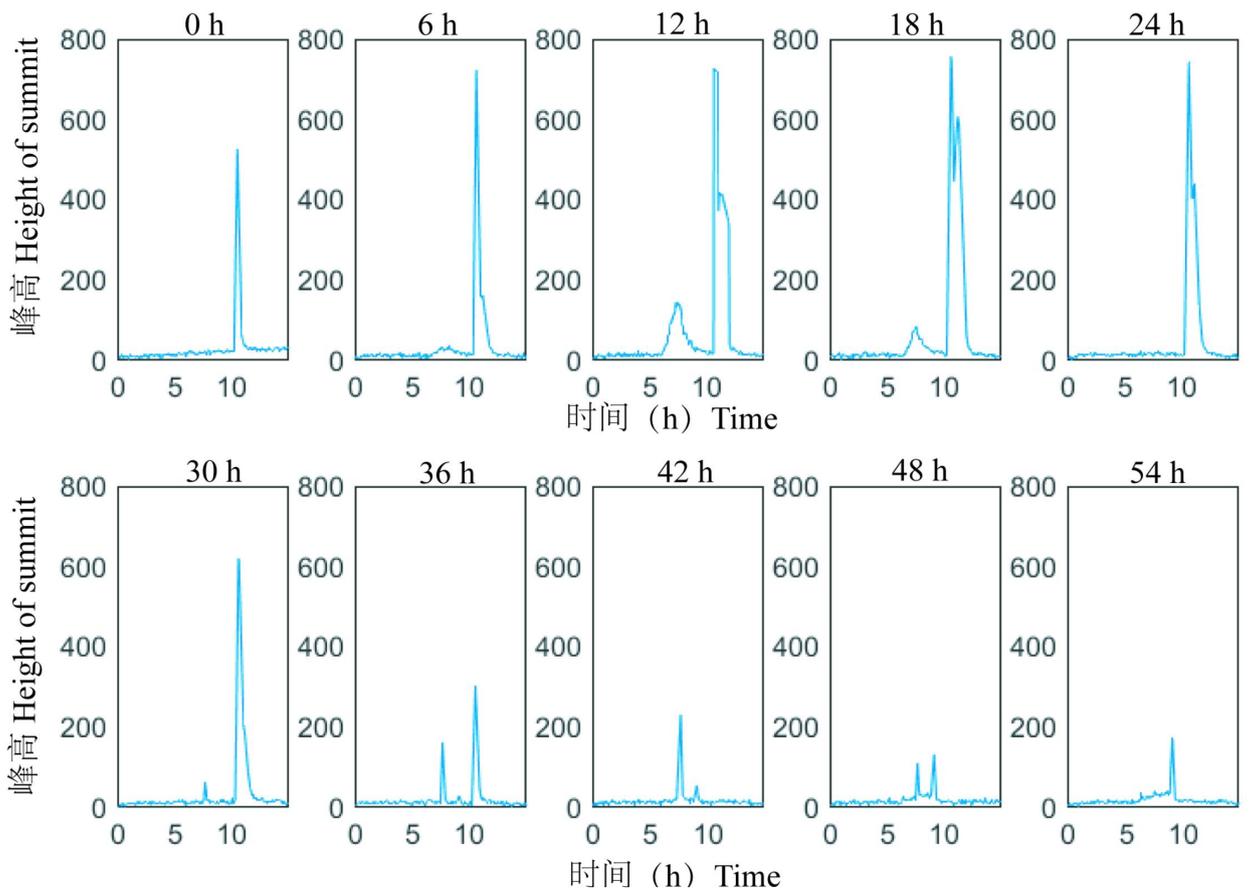
注：A，Pu17 菌不同接种量在烟碱浓度为 2.0 g/L 的纯烟碱培养基中的生长拟合曲线；B，Pu17 接种量为 2% 时在烟碱浓度为 2.0 g/L 的纯烟碱培养基中不同时间的生长拟合曲线；C，Pu17 不同接种量在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中的生长拟合曲线；D，Pu17 接种量为 2% 时在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中不同时间的生长拟合曲线。Note: A, Growth fitting curves of Pu17 bacteria with different inoculations in nicotine medium with nicotine concentration of 2.0 g/L; B, Growth curves of Pu17 inoculated at 2.0% in pure nicotinic medium with nicotine concentration of 2.0 g/L for different time periods; C, Growth fitting curves of Pu17 with different inoculations in LB medium with nicotine concentration of 2.0 g/L; D, Growth curves of Pu17 inoculated at 2.0% in LB medium with nicotine concentration of 2.0 g/L for different time periods.

2.6 Pu17 对不同培养基中烟碱的降解能力

Pu17 在烟碱培养基中对烟碱的降解情况（图 6-A）。Pu17 菌在烟碱浓度为 2.0 g/L 的烟碱培养基中可以正常生长繁殖，并可以有效降解烟碱（图 6-A）。HPLC 色谱峰图显示 Pu17 菌株在 36 h 即可降解大部分烟碱，48 h 对烟碱降解率达到 92.75% 以上。通过 HPLC 色谱峰图分析可知，Pu17 将烟碱转化为烟碱类似物逐步降解烟碱。

Pu17 菌株在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中的降解情况（图 6-B）。Pu17 菌在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中快速生长，但在 48 h 时仍存在大部分烟碱。在 54 h，烟碱才被大量降解；60 h 降解率达 90.57%。Pu17 菌在烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 培养基中的生长速率快于在纯烟碱培养基的生长速率，但 Pu17 菌在中烟碱浓度为 2.0 g/L 的 LB 中降解烟碱效率远远低于烟碱培养基（图 6）。因此推测该菌在有其他营养物质存在的条件下会优先利用其他营养物质，同时缓慢降解烟碱；或在该菌降解烟碱的代谢通路中，Pu17 先将烟碱降解为某种烟碱类似物后，若有其他营养物质存在的条件下，优先利用其他营养物质进行生长代谢。如图 5 和图 6 所示，Pu17 菌株烟碱降解率与生长量呈正相关的关系。在 2 种培养基中，随着 Pu17 菌株的生长，烟碱不断被降解。在烟碱培养基中，培养 48 h，Pu17 菌株生长量达到最大，此时烟碱的降解率达 92.75%，在烟碱浓度为 2 g/L 的 LB 培养基中，培养 60 h，Pu17 菌株生长量达到最大，此时烟碱的降解率达 90.57%。

A



B

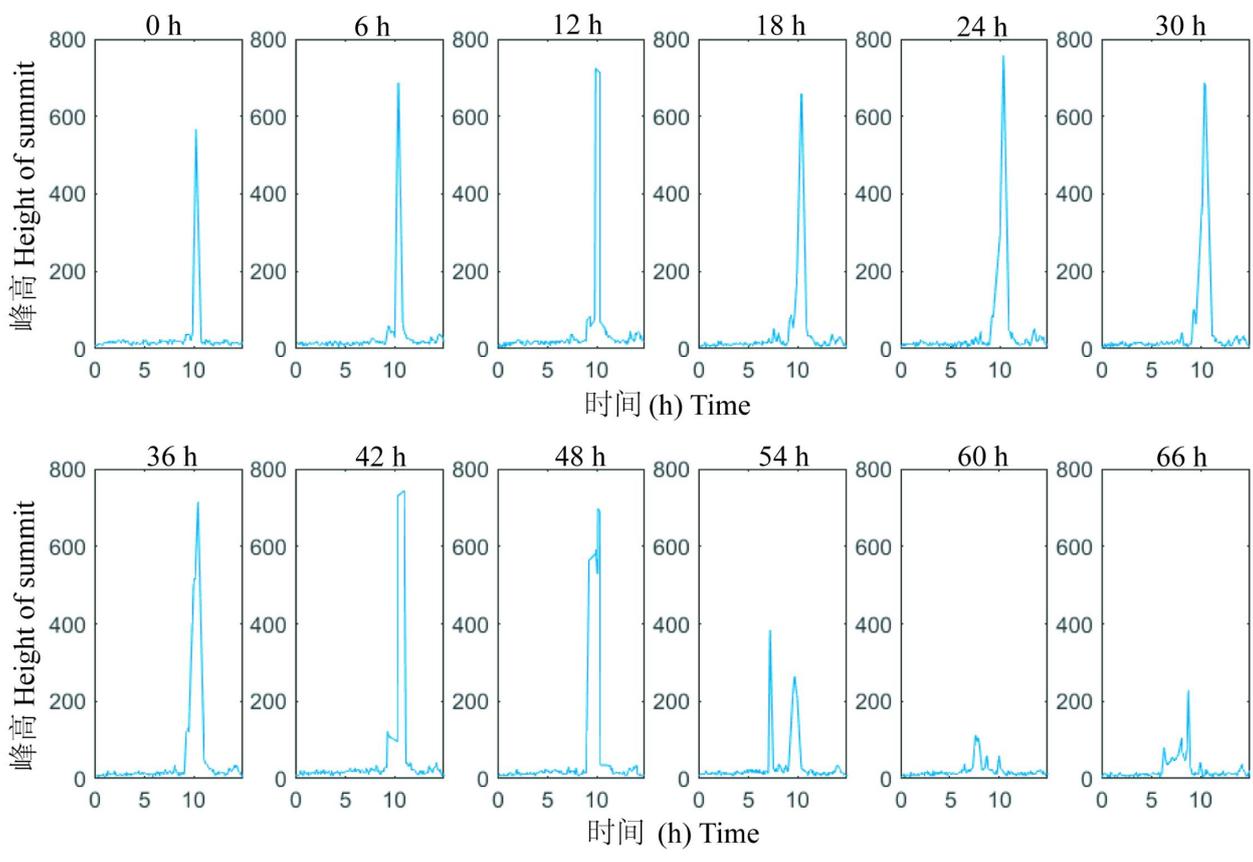


图 6 2.0%接种量对 2.0 g/L 烟碱浓度的不同培养基中烟碱的降解情况

Fig. 6 Degradation rate of nicotine in medium with 2.0 g/L nicotine concentration at 2.0% inoculation rate

注：A, 2%接种量的 Pu17 对 2.0 g/L 烟碱浓度的纯烟碱培养基中的烟碱降解速率；B, 2%接种量对 2.0 g/L 烟碱浓度的 LB 培养基中烟碱的降解速度。Note: A, The rate of nicotine degradation in a pure nicotine medium with a nicotine concentration of 2.0 g/L was determined by 2.0% inoculation of Pu17; B, Degradation rate of nicotine in LB medium with 2.0 g/L nicotine concentration at 2.0% inoculation rate.

2.7 Pu17 对烟草植株上烟碱的降解

Pu17 喷施烟草后，在 0~60 h 之间，利用紫外分光光度计测定烟草植株中的烟碱含量。喷施 Pu17，24~60 h 都可以显著降低烟叶上的烟碱含量（图 7）。通过 t 检验分析，喷施 Pu17 后 24 h 时，烟碱含量与对照植株相比达到极差异显著水平 ($P < 0.0001$)，而 48 h 和 60 h 时相比于 CK 组烟叶叶片中的烟碱含量也达到差异显著水平 ($P < 0.05$)。本研究说明喷施 Pu17 后，随着时间的推移，烟叶叶片中的烟碱含量逐渐升高，呈现回原趋势，但是仍然达到差异水平，说明 Pu17 能够降解烟草植株里的烟碱。

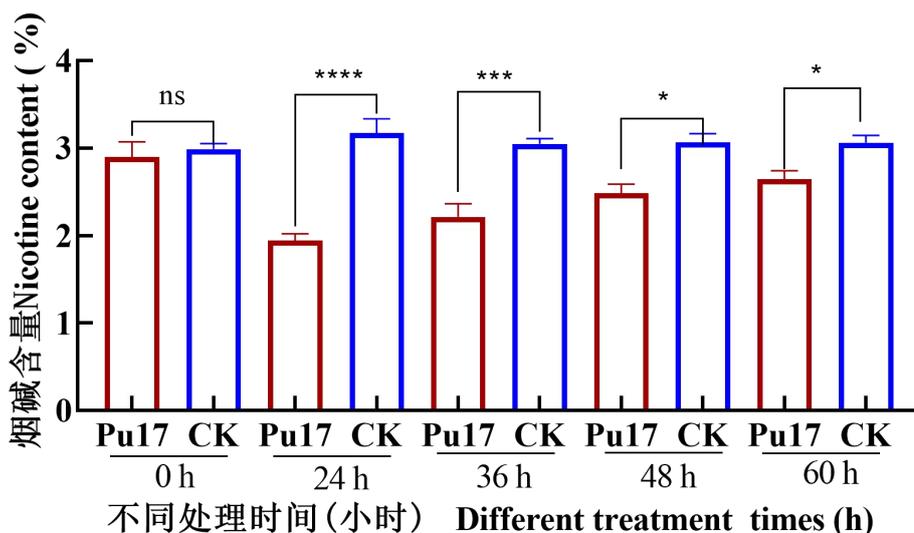


图 7 喷施 Pu17 对烟叶中烟碱含量的降解效果

Fig. 7 Degradation effect of Pu17 on nicotine content in tobacco leaves

注：图中数值为平均值±标准误 (n=3)，柱上不同星号表示烟碱含量差异显著 (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, $P > 0.05$; 多重 t 检验)。Note: Each bar presented the mean±SE (n=3), and asterisk above each bar indicated a significant difference of the content of nicotine in tobacco leaves (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$; ns, $P > 0.05$; multiple t tests).

3 结果与讨论

利用微生物降解烟碱是最有发展前景的方法。节杆菌 *Arthrobacter sp.* 是降解烟碱最重要的一类微生物。节杆菌属的降解途径从吡啶环开始降解尼古丁，又称吡啶途径。

节杆菌属利用烟碱唯一的碳源、氮源和能源生长 (Wang *et al.*, 2012; Valentine *et al.*, 2018)。本研究从湖南永州市烟叶生产技术中心烟草种植区内土壤中分离得到一株烟碱降解菌, 通过形态学、16S rRNA 序列同源性分析, 系统发育和酶活鉴定, 初步确定为节杆菌属产脲节杆菌, 命名为 Pu17 菌株。具体是否为该属新种还需进一步做代谢组分析分析、基因组平均核苷酸相似度和全基因组测序。

目前国内外从节杆菌属 *Arthrobacter* sp. 中分离烟碱降解菌报道很多。但是节杆菌属烟碱降解菌效率和特性差异很大, 应用前景不同。郭青青等从土壤中分离出高效烟碱降解节杆菌 P3, 36 h 内降解率可达 99.06%; 马林从土壤中分离的嗜烟碱节杆菌 Z3, 培养 78 h 后烟碱降解 80% (马林, 2005; Wang *et al.*, 2009; 江吉红等, 2011; 孔雯等, 2011; Wang *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014; Valentine *et al.*, 2018; 苏丹等, 2021; 郭青青等, 2022)。本研究从土壤中筛选获得 Pu17 属于节杆菌, HPLC 检测显示出 Pu17 具有高效烟碱降解性能。Pu17 菌株在烟碱浓度为 2 g/L 的烟碱培养基可以有效降解烟碱, 在 36 h 即可降解大部分烟碱, 48 h 烟碱降解率达到 92.75% 以上 (图 6-A)。通过 HPLC 色谱峰图分析 Pu17 菌株会将烟碱转化为烟碱类似物逐步降解烟碱 (图 6-A)。本研究与其他人报道一致 (马林, 2005; 李颖等, 2006; 申星等, 2013; 张文龙等, 2013; 帖金鑫等, 2014)。

烟碱降解菌有不同的降解特性, 培养的 pH 值、温度和营养状态下表现不同降解效果。本研究中, 发现菌株 Pu17 降解烟碱的效率与培养的温度、pH 和底物浓度密切相关。温度对菌株 Pu17 降解烟碱的影响主要是因为温度对微生物的增殖有着显著影响, 菌株 Pu17 的适宜降解温度是 30°C (图 4-B)。我们的结果与 Wang 等人报道的结果相似, 当温度超过 37°C 或低于 20°C 时, 烟碱的降解能力急剧下降 (Wang *et al.*, 2012; Valentine *et al.*, 2018)。烟碱不仅为烟碱降解菌提供碳源和氮源, 为微生物的生长提供营养物质, 也具有高毒性, 过高的烟碱浓度会抑制微生物的生长 (董春霞等, 2011; 方超等, 2017)。节杆菌属菌株 D4, 培养 18 h 时 D4 对 1.0 g/L 烟碱降解率可达到 90% 以上; 当烟碱浓度大于或等于 4.0 g/L 时, D4 菌生长受到明显抑制 (邓帅军等, 2022)。本研究发现 Pu17 菌株具有较高烟碱耐受力 and 烟碱降解率, 发现该菌株在烟碱浓度 0.1~7.0 g/L 内生长良好且有较高的烟碱降解能力 (图 4)。烟碱浓度大于或等于 8.0 g/L 时菌株生长受到明显抑制 (图 4-A)。这结果与邓帅军等 (2022) 报道的烟碱降解微生物特点的相一致。Pu17 相比苍白杆菌 P3a (5.0 g/L)、苍白杆菌 SJY1 (3.0 g/L) 和假单胞菌 HF-1 (2.0 g/L) 的烟碱耐受性, Pu17 有很强的耐受性 (Yu *et al.*, 2015; 郭青青等, 2022; 王萌蕾等, 2023)。Pu17 在 pH6.0~7.0 之间有显著的降解速率, 说明中性或弱酸性环境有助于菌株 Pu17 对烟碱的降解 (图 4-C)。这结果与节杆菌属菌株 P3a、假单胞菌属 HF-1 和节杆菌 aRF-1 相似, 最佳 pH 为 6.5~7.0 (郭青青等, 2022); 也与 Wang 等 (2012) 报道 *Pseudomonas* sp. CS3 对烟碱的最适 pH 也为中性环境。通

过 HPLC 检测 Pu17 对烟碱质量浓度为 2 g/L 的不同 pH 值烟碱培养基中的烟碱降解效率不一致, 适宜 pH 值为 6, 此时 Pu17 对烟碱降解率为 92.75% (图 4-D)。

生长-降解关系显示 Pu17 生长速度与烟碱降解速度具有同步性 (图 6)。Pu17 生长速度与烟碱降解速度的同步性, 进一步说明 Pu17 可以通过降解烟碱来获取自身生长繁殖所需要的能量, 这与 Wang 和 Li 等人报道的烟碱降解微生物的生长-降解关系相一致 (Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010)。有关烟碱与其他营养物质同时存在时, 烟碱降解菌如何对烟碱的选择降解未见报道。本研究利用 HPLC 动态比较了 Pu17 对 LB 培养基中的烟碱和烟碱培养中的烟碱降解情况 (图 6-A、B), 显示 Pu17 在烟碱浓度为 2 g/L 的纯烟碱培养基中具有较高的烟碱降解率, 在其他营养物质的存在下, Pu17 对于烟碱的降解速率明显降低, 因此推测 Pu17 在有其他营养物质存在的条件下会优先利用其他营养物质, 同时缓慢降解烟碱; 或在该菌降解烟碱的代谢通路中, Pu17 菌株先将烟碱降解为某种烟碱类似物后, 若有其他营养物质存在的条件下, 优先利用其他营养物质进行生长代谢。本研究与已报道的研究结果相比有一致性, 也有一定的独特性 (龙章德等, 2013; 梅枫等, 2017; 苏丹等, 2021; 王萌蕾等, 2023)。

到目前为止, 直接将降解菌应用到鲜株的烟草中未见报道。国内只有郭青青从土壤中分离出一株高效降解烟碱的节杆菌 *Arthrobacter* sp.P3a, 将菌株 P3a 培养 24 h 的发酵液, 100 mL (5×10^9 CFU/mL) 菌液喷洒 1 kg 新鲜烟叶。紫外分光光度法烟碱含量, 结果发现 P3a 降低 1 kg 新鲜烟叶中 55.11% 的烟碱 (郭青青等, 2022)。本研究将 Pu17 菌株发酵液直接喷施在烟田中的烟草。结果发现 Pu17 喷施田中的烟草 24 h 后, 降解率最高, 烟碱降解率为 38.72% (图 7); 喷施烟草 60 h, 烟碱降解率减低, 烟叶降解率为 14% (图 7)。说明随着时间的推移, 烟叶叶片中的烟碱含量逐渐升高, 呈现回原趋势, 但是仍然达到差异水平 (图 7)。本实验室将进一步展开 Pu17 对烟草植株的降解机理工作, 目前已经完成了 Pu17 的基因组学和代谢组学测序, 数据正在分析中。

参考文献 (References)

- Alhazmi HA. Determination of nicotine content in locally produced smokeless tobacco (Shammah) samples from Jazan region of Saudi Arabia using a convenient HPLC-MS/MS method [J]. *Open Chemistry*, 2023, 21 (1): 935-944.
- Brown DA, Scholfield CN. Nicotine washout rates from isolated rat ganglia in relation to recovery from nicotine depolarization[J]. *British Journal of Pharmacology*, 1972, 45 (1): 29-36.
- Brown RA, Lichtenstein E, McIntyre KO, *et al.* Effects of nicotine fading and relapse prevention on smoking cessation [J]. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 1984, 52 (2): 307-308.
- Deng SJ, Zhang G, Liu DS, *et al.* Isolation identification and metabolic pathway of a nicotine-degrading strain *Arthrobacter* sp. D4 [J]. *Microbiology China*, 2022, 49 (9): 3644-3656. [邓帅军, 张鸽, 刘德水, 等. 一株烟碱降解菌株 *Arthrobacter* sp.D4 的分离鉴定及其降解代谢途径 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49 (9): 3644-3656]
- Dong CX, Diao LL, Chen Y, *et al.* Research progress of nicotine-degrading bacteria and their application in industry [J]. *Modern Agricultural Technology*, 2011, 11: 42-46. [董春霞, 刁玲玲, 陈瑶, 等. 烟碱降解菌及其在工业上的应用研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2011, 11: 42-46]

- Fang C, Ruan AD. Isolation and characterization of a nicotine degradation bacterium [J]. *Environmental Science and Technology*, 2017, 30 (3): 17-22. [方超, 阮爱东. 一株烟碱降解菌的筛选鉴定与降解特性研究 [J]. 环境科技, 2017, 30 (3): 17-22]
- Fernandes MFR, Ribeiro TG, Rouws JR, *et al.* Biotechnological potential of bacteria from genera *Bacillus Paraburkholderia* and *Pseudomonas* to control seed fungal pathogens[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52 (2): 705-714.
- Frankenburg WG, Vaitekunas AA. Chemical studies on nicotine degradation by microorganisms derived from the surface of tobacco seeds [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1955, 58 (2): 509-512.
- Gibson AM, Bratchell N, Roberts TA. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1987, 62 (6): 479-490.
- Guo QQ, Xu TC, Yang CL, *et al.* Screening of a highly effective nicotine-degrading bacterium and its application in tobacco baking [J]. *Anhui Agricultural Science*, 2022, 50 (16): 45-49. [郭青青, 许天驰, 杨春雷, 等. 一株高效烟碱降解菌的筛选及其在烟草烘烤中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50 (16): 45-49]
- Jiang JH, Ying SH, WU LF, *et al.* Isolation and characterization of a nicotine-degrading bacterium [J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2011, 39 (6): 614-618. [江吉红, 商弘颖, 吴立飞, 等. 烟碱降解菌的分离鉴定和初步特性研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2011, 39 (6): 614-618]
- Kong W. Preliminary Study on Isolation, Identification, Degradation Characteristics and Degradation Pathway of Nicotinic Degrading Bacteria [D]. Wuhan: South-Central Minzu University, 2011. [孔雯, 烟碱降解菌的分离鉴定、降解特性及其降解途径的初步研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2011]
- Li H, Li X, Duan Y, *et al.* Biotransformation of nicotine by microorganism: The case of *Pseudomonas* spp. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86 (1): 11-17.
- Li XM, Chen YR, Luo YJ, *et al.* Study on degradation of nicotine and chlorogenic acid in tobacco residues by two strains of *Bacillus* sp. [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2005, 3 (4): 58-61, 70. [李雪梅, 陈育如, 骆跃军, 等. 两株芽胞菌对烟草废料烟碱与绿原酸降解的研究 [J]. 生物加工过程, 2005, 3 (4): 58-61, 70]
- Li Y, Yuan YJ, Lu ZX, *et al.* Isolation and purification of *Ochrobacterum intermedium* DN2, a novel nicotine-degrading enzyme [J]. *Food Science*, 2006, 12: 287-290. [李颖, 袁勇军, 陆兆新, 等. *Ochrobacterum intermedium* DN2 新型烟碱降解酶的分离纯化 [J]. 食品科学, 2006, 12: 287-290]
- Long ZD, Wei FL, Li JF, *et al.* Screening, isolation and identification of a high concentration nicotine degradation bacterium strain [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32 (5): 612-615. [龙章德, 韦方立, 李俊芳, 等. 一株高浓度烟碱降解菌的筛选、分离和初步鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32 (5): 612-615]
- Ma L. Study on Nicotinic Dehydrogenase Properties of *Arthrobacter nicotinophilus* and its Application in Tobacco Processing [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005. [马林. 嗜烟碱节杆菌烟碱脱氢酶性质及其在烟草加工中的应用研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005]
- Mei F, Kong W, Li A, *et al.* Isolation and gene characterization of a nicotine-degradation strain *Agrobacterium tumefaciens* SCUEC1 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57 (5): 701-709. [梅枫, 孔雯, 李阳, 等. 烟碱降解菌 SCUEC1 菌株的分离及其降解基因 [J]. 微生物学报, 2017, 57 (5): 701-709]
- Passananti M, Temussi F, Iesce MR, *et al.* Photoenhanced transformation of nicotine in aquatic environments: Involvement of naturally occurring radical sources [J]. *Water Research*, 2014, 55: 106-114.
- Peng C, Jin FL, Zhang XW, *et al.* A kind of efficient nicotine-degrading *Bacillus* Pu17 and its application: CN116445335A [P]. 2023-07-18. [彭琛, 金丰良, 张学伟, 等. 一种高效降解烟碱的产脲节杆菌 Pu17 及其应用: CN116445335A [P]. 2023-07-18]
- Ruan AD, Bao TL, Liu CX, *et al.* Effects of nicotine pollution on the activity of functional enzymes of soil bacteria [J]. *Sichuan Environment*, 2015, 34 (5): 7-11. [阮爱东, 包天力, 刘忱潇, 等. 烟碱污染对土壤细菌功能酶活性的影响 [J]. 四川环境, 2015, 34(5): 7-11]
- Shen X, Zhang J, Peng Y, *et al.* Screening and identification of an endophytic bacterium degrading nicotine in tobacco [J]. *Processing of Agricultural Products*, 2013, 14: 69-71. [申星, 张娟, 彭宇, 等. 一株降解烟碱烟草内生菌的筛选与鉴定 [J]. 农产品加工, 2013, 14: 69-71]
- Su D, Lin ZH, Wang XR, *et al.* Screening and identification of a highly efficient nicotine-degrading endophyte in tobacco and its metabolic pathways [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2021, 52 (3): 279-286. [苏丹, 林智慧, 王雪, 等. 一株高效降解烟碱烟草内生菌的筛选、鉴定及其代谢途径研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2021, 52 (3): 279-286]

- Su YL. Study on Screening and Characteristics of Highly Effective Tobacco Culm Degrading Strains [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2016. [苏玉龙. 高效降解烟秆菌株筛选及其特性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院作物栽培学与耕作学, 2016]
- Tie JX, Zhang XH, Yu X, *et al.* Response surface method was used to optimize the degradation conditions of burley tobacco nicotine by *Arthrobacter Z3* solution [J]. *Henan Agricultural Science*, 2014, 43 (12): 160-164. [帖金鑫, 张相辉, 余翔, 等. 响应面法优化节杆菌 Z3 菌液降解白肋烟烟碱条件 [J]. 河南农业科学, 2014, 43 (12): 160-164]
- Valentine G, Sofuoglu M. Cognitive effects of nicotine: recent progress [J]. *Current Neuropharmacology*, 2018, 16 (4): 403-414.
- Wan H, Zhao HG, Song JZ, *et al.* Screening, identification and degradation characteristics of high-concentration nicotine-degrading bacteria [J]. *Tobacco Technology*, 2009, 4: 50-53. [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]
- Wang ML, Xu BT, Xia ZZ, *et al.* Cloning and functional analysis of *ocnH* gene involved in nicotine degradation in *Ochrobactrum intermedium* strain [J]. *Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2023, 42 (4): 457-461. [王萌蕾, 许倍滔, 夏珍珍, 等. 中间苍白杆菌烟碱降解相关基因 *ocnH* 的克隆及功能分析 [J]. 中南民族大学学报 (自然科学版), 2023, 42 (4): 457-461]
- Wang S, Huang H, Xie K, *et al.* Identification of nicotine biotransformation intermediates by *Agrobacterium tumefaciens* strain S33 suggests a novel nicotine degradation pathway [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95 (6): 1567-1578.
- Wang SN, Liu Z, Xu P. Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain S33 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107 (3): 838-847.
- Wei X, Deng X, Cai D, *et al.* Decreased tobacco-specific nitrosamines by microbial treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* DA9 during the air-curing process of burley tobacco [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62 (52): 12701-12706.
- Yu H, Tang HZ, Zhu XY, *et al.* Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. strain SJY1 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (1): 272-281.
- Zhang HY, Dang BJ, Jin YN, *et al.* Research progress on bioregulation of nicotine in grass waste [J]. *Environ Pollut Preven*, 2021, 43 (6): 772-778. [张豪洋, 党炳俊, 金伊楠, 等. 烟草废弃物中烟碱生物调控的研究进展 [J]. 环境污染与防治, 2021, 43 (6): 772-778]
- Zhang J. Screening of Nicotine-degrading Bacteria and Purification and Characterization of their Enzymes [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012. [张娟. 烟碱降解菌的筛选及其酶的纯化与性质研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2022]
- Zhang WL, Zhang XH, Kou XT, *et al.* Conditions optimization of *Arthrobacter Z3* crude enzyme solution degradate nicotine in the Burley tobacco [J]. *Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science)*, 2013, 28 (3): 20-23. [张文龙, 张相辉, 寇霄腾, 等. 节杆菌 Z3 粗酶液降解白肋烟烟碱条件优化 [J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2013, 28 (3): 20-23]