

白肋烟内生细菌的分离鉴定及降低 N-亚硝胺含量研究

祝明亮¹ 李天飞² 汪安云¹

(¹ 云南省烟草科学研究所 玉溪 653100)

(² 玉溪红塔烟草集团有限责任公司 玉溪 653100)

摘 要 :以表面消毒法分离白肋烟 TN90 和 TRM 品种 30 个样品的内生细菌,共分离到 33 株内生细菌。对这些菌株进行了初步分类鉴定,它们属于假单胞菌属、黄单胞菌属、节杆菌属、葡萄球菌属、棒杆菌属、黄杆菌属、气球菌属和利斯特氏菌属。筛选出 TEB11、TEB17、TEB23、TEB26、TEB30、TEB34 等 6 株还原硝酸盐和亚硝酸盐能力较强的菌株,以粉碎烟叶接种、叶柄浸泡接种和叶面喷雾接种 3 种方式处理调制后,化验分析结果表明,接种内生细菌能降低 27.56%~99.88% 白肋烟 TSNA 含量,降低百分率以粉碎烟叶接种最高,其次是叶柄浸泡接种,叶面喷雾接种最低。

关键词 :白肋烟,内生细菌,分离,鉴定,TSNA 含量

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2004)04-0422-05

植物内生细菌几乎存在于所有目前已研究过的植物中,分布广,种类多。它们具有促生、抗病、抗虫、抗逆、固氮等作用,近年来研究十分活跃^[1]。

烟草特有的 N-亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines,简称 TSNA)是一组仅发现于烟草及其制品的致癌物质,主要包括 N-亚硝基去甲基烟碱(NNN)、4-(N-甲基-亚硝基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)、N-亚硝基新烟草碱(NAT)和 N-亚硝基假木贼碱(NAB)等 4 种成分,其中 NNN 和 NNK 具有显著的致癌作用,而 NAB 和 NAT 则无明显的致癌作用^[2]。过去 20 年以来,TSNA 成为烟草科学研究中最受关注的领域之一^[3]。TSNA 在不同烟草类型中的含量以白肋烟最高,香料烟和烤烟含量都较低。研究证明,TSNA 的主要前体物质是生物碱和硝酸盐、亚硝酸盐,在收获前的绿色烟叶中没有 TSNA 存在,它们产生于收获后的调制和发酵过程,TSNA 的积累与烟叶上细菌的生长密切相关^[4~8]。

有关白肋烟内生细菌的研究至今未见报道。本研究对白肋烟内生细菌进行分离、鉴定,测定筛选硝酸盐和亚硝酸盐还原能力较强的内生细菌,利用它们接种成熟白肋烟叶,发现能够降低白肋烟 TSNA 含量而对烟草生物碱无影响,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 白肋烟品种

供试白肋烟品种为 TN90(*Nicotiana tabacum* L.

cv. TN 90)和 TRM(*Nicotiana tabacum* L. cv. TR-Model),按常规方法栽培于肯德基大学农学院温室。

1.2 培养基

本研究所用固体培养基为 TSA(Tryptic Soy Agar),液体培养基为 TSB(Tryptic Soy Broth),均为 Difco 公司产品。

1.3 内生细菌的分离

采集健康生长于温室移栽 3 个月后的烟株叶子,带回实验室处理,2 个品种共 30 个样品,其中 TN90 品种 14 个样品,TRM 品种 16 个样品。每个样品取 1g 主脉,用自来水冲洗表面灰尘,吸水纸吸去水分,75%乙醇浸 5min,再转入含 0.05% TritonX-100 的 0.5% 次氯酸钠溶液中浸 5min,无菌水反复冲洗,无菌吸水纸吸干,用无菌剪子剪碎在无菌研钵中,加 9mL 无菌水充分研磨至匀浆,系列稀释后取适当浓度稀释液涂布于 TSA 平板上,35℃ 恒温暗培养 2~3d 直至长出单菌落。以最后一次的冲洗液涂布 TSA 平板检查样品表面消毒是否彻底。根据菌落颜色、形态、干湿、高度、透明度、边缘等特征从涂布的 TSA 平板挑取有代表性的单菌落保存于 TSA 斜面,同时计数每个样品内生细菌总数。

1.4 内生细菌对硝酸盐和亚硝酸盐还原能力的测定

将所有待测菌株接种于 TSA 平板培养 18h,加入 1mL 无菌水制成浓菌悬液,分别取 0.5mL 加入 5mL 含 0.2% 硝酸钾的 TSB 培养液和含 0.2% 亚硝

基金项目:国家烟草专卖局科技计划资助项目(110200202004B)

作者简介:祝明亮(1972-)男,贵州遵义人,博士,助理研究员,主要从事烟草微生物研究。Tel:86-877-2053302;Fax:86-877-2051014;E-mail:mingliangzhu@hotmail.com

收稿日期:2003-11-18,修回日期:2004-03-08

酸钠的 TSB 培养液的试管中,35℃ 恒温暗培养。每种培养液均以不接种菌悬液为对照。在培养 1、3、5、7d 后,分别按常规方法确定各菌株硝酸盐和亚硝酸盐的还原能力。

1.5 内生细菌的鉴定

鉴定内生细菌的革兰氏染色、芽孢染色、运动性观察、甲基红(M.R)、V-P 测定、葡萄糖发酵、氧化酶、接触酶、赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶、硫化氢还原、吡啶等试验参照文献^[9,10]进行。

1.6 内生细菌处理对白肋烟 TSNA 及相关化学成分的影响

1.6.1 供试内生细菌:经筛选,内生细菌 *Pseudomonas* sp. TEB11、*Flavobacterium* sp. TEB17、*Pseudomonas* sp. TEB23、*Xanthomonas* sp. TEB26、*Pseudomonas* sp. TEB30 和 *Rhizobium* sp. TEB34 对硝酸盐和亚硝酸盐具较强的还原能力。将供试菌株在 TSA 平板上培养 18h 后,分别接种于 TSB 培养液,室温 150r/min 培养 3d,使用前调整培养液浓度为 10^8 cfu/mL。

1.6.2 内生细菌的接种:采集生长成熟的白肋烟烟叶,分别按以下 3 种方式接种处理(1)新鲜烟叶用粉碎机粉碎,充分混匀,以浓度为 10^8 cfu/mL 的菌悬液接种,使接种体浓度为 5%,然后放置 35℃ 恒温培养 7d 后测定 TSNA 等含量(2)将新鲜烟叶叶柄基部 1.5cm 浸于 10^8 cfu/mL 的菌悬液,48h 后在室温自然调制 3 周后测定 TSNA 等含量(3)以浓度为 10^8 cfu/mL 的菌悬液均匀喷洒于新鲜烟叶表面,风干后在室温自然调制 3 周后测定 TSNA 等含量。以不接种内生细菌的培养液为对照,每处理 3 个重复。

1.6.3 TSNA、硝酸盐、亚硝酸盐及生物碱的测定:4 种 TSNA 主要成分 NNN、NAT、NAB、NNK,硝酸盐和亚硝酸盐根据 Burton 等^[5]方法测定,4 种烟草生物碱烟碱(Nicotine)、降烟碱(Nornicotine)、新烟碱(Anabasine)和新烟草碱(Anatabine)根据 Severson 等^[11]方法测定。所有化学成分均由肯塔基大学农学院烟草化学分析室完成。

2 结果

2.1 白肋烟内生细菌的分离

从 2 个白肋烟品种 30 个样品共分离到内生细菌 33 株,其中分离自 TN90 品种 22 株,分离自 TRM 品种 11 株。品种 TN90 内生细菌总数为每克鲜样 50~300 个菌落繁殖单位(cfu),平均为 108 cfu/g 鲜样;品种 TRM 内生细菌总数则为 50~450 cfu/g 鲜样,平均为 167 cfu/g 鲜样,可见品种 TRM 内生细菌

总量大于品种 TN90。但从内生细菌类群上看,从品种 TN90 的 14 个样品分离到 22 株内生细菌,从品种 TRM 的 16 个样品仅分离到 11 株,表明品种 TN90 较 TRM 具有更大的内生细菌种类多样性。

2.2 内生细菌还原硝酸盐和亚硝酸盐能力的测定

33 株内生细菌中 22 株具有硝酸盐还原能力,13 株具有亚硝酸盐还原能力。通过不同培养时间检测结果可知,不同菌株还原硝酸盐和亚硝酸盐的能力不同。

2.3 白肋烟内生细菌的鉴定

33 株内生细菌的主要鉴定特征见表 1,根据《伯杰氏细菌鉴定手册》,它们分别属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)10 株,黄单胞菌属(*Xanthomonas*)9 株,节杆菌属(*Arthrobacter*)4 株,葡萄球菌属(*Staphylococcus*)3 株,棒杆菌属(*Corynebacterium*)2 株,黄杆菌属(*Flavobacterium*)2 株,根瘤菌属(*Rhizobium*)1 株,气球菌属(*Aerococcus*)1 株和利斯特氏菌属(*Listeria*)1 株。可见 *Pseudomonas* 属和 *Xanthomonas* 属为白肋烟内生细菌主要类群,分别占 30.3%和 27.3%。

2.4 内生细菌处理对白肋烟硝酸盐、亚硝酸盐及 TSNA 含量的影响

处理粉碎烟叶后各处理样品的硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNA 等化学成分含量见表 2。处理后白肋烟硝酸盐含量均比对照处理低,除菌株 TEB34 处理的亚硝酸盐含量约高于对照外,其余菌株处理的亚硝酸盐含量都低于对照处理。所有菌株处理后白肋烟 NNN、NAT、NAB、NNK 及 TSNA 含量均明显低于对照处理,菌株 TEB11、TEB17、TEB23、TEB26、TEB30、TEB34 对白肋烟 TSNA 含量的降低率分别为 99.70%、99.88%、99.64%、98.16%、98.72% 和 61.28%。

叶柄接种处理后各处理样品的硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNA 等化学成分含量见表 3。除菌株 TEB26、TEB30 处理后白肋烟硝酸盐含量低于对照处理外,其余菌株处理的硝酸盐含量均高于对照处理,除菌株 TEB17 处理的亚硝酸盐含量约高于对照外,其余菌株处理的亚硝酸盐含量都低于对照处理。所有菌株处理后白肋烟 NNN、NAT、NAB、NNK 及 TSNA 含量均明显低于对照处理,菌株 TEB11、TEB17、TEB23、TEB26、TEB30、TEB34 对白肋烟 TSNA 含量的降低率分别为 84.87%、89.99%、94.11%、89.82%、95.53% 和 98.28%。

表 1 33 株内生细菌主要鉴定特征

Table 1 Main identification characteristics of 33 isolates of endophytic bacteria

Isolates	Main identification characteristics															Genus
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
TEB1	+	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB2	-	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB4	+	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB6	+	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB7	+	-	+	X	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
TEB9	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB10	+	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB11	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB12	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB13	-	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB14	-	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB15	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB16	+	-	-	X	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>Flavobacterium</i> sp.
TEB17	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	<i>Flavobacterium</i> sp.
TEB18	+	-	+	Y	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
TEB19	-	-	+	X,Y	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
TEB20	+	+	+	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
TEB22	-	-	-	X	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB23	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB24	-	-	-	X	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB26	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB27	-	-	+	Y	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
TEB30	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
TEB33	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB34	+	+	+	X	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>Rhizobium</i> sp.
TEB35	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB37	+	+	-	X	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	<i>Xanthomonas</i> sp.
TEB38	-	-	+	X	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
TEB39	+	-	+	X,Y	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
TEB40	-	-	+	X	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
TEB41	-	-	+	X	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
TEB42	+	-	+	Y	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.
TEB43	-	-	+	Y	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Aerococcus</i> sp.

1. Nitrate reduction ; 2. Nitrite reduction ; 3. Gram reaction ; 4. Shape ; 5. Glucose fermentation ; 6. Spore ; 7. Catalase ; 8. Oxidase ; 9. MR test ; 10. VP test ; 11. L-Lysine decarboxylase ; 12. L-Ornithine decarboxylase ; 13. Sulfur reduction ; 14. Indole production ; 15. Motility. X : Rod ; Y : Coccus. + : Positive ; - : Negative.

表 2 6 株内生细菌处理粉碎烟叶对硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNA 含量的影响

Treatment	Contents($\mu\text{g/g}$)						
	NO ₃ N	NO ₂ N	NNN	NAT	NAB	NNK	TSNA
TEB11	500.00	21.10	0.07	0.41	0	0.16	0.64
TEB17	653.85	8.35	0.04	0.15	0	0.06	0.25
TEB23	628.21	20.32	0.02	0.37	0	0.37	0.76
TEB26	730.77	189.49	0.44	1.22	0.01	2.21	3.88
TEB30	371.79	11.92	0.26	0.93	0.01	1.48	2.69
TEB34	4059.52	2067.59	6.08	20.68	0.46	54.34	81.56
CK	4916.67	1981.40	13.27	60.52	1.55	135.28	210.62

表 3 6 株内生细菌叶柄接种处理对硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNA 含量的影响

Treatment	Contents($\mu\text{g/g}$)						
	NO ₃ N	NO ₂ N	NNN	NAT	NAB	NNK	TSNA
TEB11	8022.39	5.49	4.98	3.61	0.06	1.01	9.66
TEB17	7502.10	14.94	3.41	2.34	0	0.63	6.39
TEB23	7210.83	2.91	1.30	2.19	0.03	0.36	3.76
TEB26	5233.33	2.41	2.42	2.80	0.05	1.23	6.50
TEB30	4103.70	2.62	0.93	1.39	0.03	0.49	2.85
TEB34	6994.17	2.17	0.42	0.63	0.02	0.04	1.10
CK	6319.60	12.77	26.59	24.65	0.44	12.15	63.83

叶面接种处理后各处理样品的硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNA 等化学成分含量见表 4。所有菌株处理后白肋烟硝酸盐含量都高于对照处理,除菌株 TEB30 处理的亚硝酸盐含量约低于对照外,其余菌株处理的亚硝酸盐含量都高于对照处理。各菌株处理后白肋烟 NNK、NAB、NAT 含量均比对照处理低,除菌株 TEB11 处理的 NNN 含量约高于对照外,其余菌株处理也比对照低。而菌株 TEB11、TEB17、TEB23、TEB26、TEB30、TEB34 处理对白肋烟 TSNA 含量都有降低作用,其降低率分别为 27.56%、73.71%、60.18%、42.19%、86.03%和 54.46%。

表 4 6 株内生细菌叶面接种处理对硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNA 含量的影响

Table 4 The effect of six endophytic bacteria on the contents of NO₃N, NO₂N and TSNA of leave surface sprayed

Treatment	Contents(μg/g)						
	NO ₃ N	NO ₂ N	NNN	NAT	NAB	NNK	TSNA
TEB11	11725.67	3.04	5.33	6.84	0.10	0.90	13.17
TEB17	10210.94	4.94	1.99	2.14	0.04	0.61	4.78
TEB23	13010.45	5.97	3.49	2.82	0.06	0.87	7.24
TEB26	9738.14	3.82	3.16	6.14	0.01	1.20	10.51
TEB30	9921.24	1.95	1.02	1.24	0.02	0.26	2.54
TEB34	11795.21	12.30	2.52	4.49	0.06	1.21	8.28
CK	9918.67	2.91	5.21	10.62	0.17	2.18	18.18

2.5 内生细菌处理对白肋烟生物碱含量的影响

以 3 种方法处理白肋烟烟叶后测定烟碱、降烟碱、新烟碱和新烟草碱的结果表明,各处理烟样的各种生物碱含量与对照基本一致,说明内生细菌处理对白肋烟生物碱含量无影响(结果未显示)。

3 讨论

本研究结果表明,健康白肋烟组织内存在内生细菌,其种类和数量与白肋烟品种有关。内生细菌存在于健康的烟草组织,而不引起烟草产生病害症状,与烟草建立了一定的共生关系,并通过其生理活动参与影响白肋烟的生长代谢。

本研究 3 种不同处理方式的对照处理 TSNA 含量分别为 210.62μg/g、63.83μg/g 和 18.18μg/g,表现出较大的差异,说明不同调制条件对白肋烟 TSNA 的积累影响较大。目前关于 TSNA 积累较公认的观点是,由于白肋烟烟叶在调制过程中细胞死亡,烟叶湿度较大,为微生物的活动创造了良好条件,一些微

生物的大量活动导致烟叶硝酸盐和亚硝酸盐的积累,它们与烟碱结合引起 TSNA 含量升高。本研究中,处理粉碎烟叶、叶柄接种处理和叶面接种处理 3 种处理方法导致白肋烟烟叶的水分含量不同,并呈依次减少的趋势。当烟叶水分含量较大时,微生物的活动更旺盛,积累硝酸盐和亚硝酸盐更多,对照处理的 TSNA 含量就更高。

供试的 6 株内生细菌经 3 种不同处理方式接种白肋烟后,均在不同程度上表现出了降低白肋烟 TSNA 含量的作用。其作用机理可能是接种这些内生细菌后,由于其种群数量远大于引起 TSNA 积累的自然微生物类群,抑制了它们的生长繁殖,而自身大量还原白肋烟叶内的硝酸盐和亚硝酸盐,减少了形成 TSNA 的前体物质,导致白肋烟 TSNA 含量下降。

3 种处理方式对白肋烟 TSNA 含量的影响表现出较大的差异,这一方面与烟叶水分含量有关,另一方面与内生细菌进入烟叶组织和细胞的方式和内生细菌与烟叶的接触面积有关。不同的接种处理方式影响了内生细菌进入烟叶组织的速度和数量,加上不同的生长环境,其还原硝酸盐、亚硝酸盐的量就不同,从而表现出烟叶 TSNA 含量的差异。当接种了还原硝酸盐和亚硝酸盐的内生细菌后,在有利于它们生长繁殖的条件下,它们将多数硝酸盐和亚硝酸盐还原为小分子氮,减少了形成 TSNA 的前体物质,使烟叶 TSNA 含量降低。从本研究结果可见,内生细菌由于直接接触粉碎烟叶和较易通过叶柄伤口进入烟叶组织细胞,而难于通过叶面气孔进入烟叶组织细胞,加上 3 种处理方法烟叶水分含量逐渐降低,因而 6 株内生细菌 3 种接种方式降低 TSNA 含量的百分率为粉碎烟叶接种最大,其次是叶柄接种,叶面接种最小。

通常认为,TSNA 含量同硝酸盐、亚硝酸盐具有正相关关系,但本研究中部分处理样品的 TSNA 含量与硝酸盐、亚硝酸盐的含量并无此规律,表明硝酸盐、亚硝酸盐转化为 TSNA 是一个比较复杂的过程,在一定条件下,硝酸盐、亚硝酸盐含量高并不意味着 TSNA 含量一定高,其相关转化反应过程有待进一步研究。

目前在控制 TSNA 含量方面,主要采取良种选育、降低施氮水平、调制及工艺改革、微生物的化学和生物化学控制等方法^[12]。本研究筛选能还原硝酸盐和亚硝酸盐的白肋烟内生细菌,通过接种处理后证明这些内生细菌对 TSNA 含量具有降低作用。

为烟草控害开辟了一条新的途径。

参 考 文 献

- [1] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. 植物学报, 2001, **43**(9): 881 – 892.
- [2] Cui M W, Burton R H, Bush L P. Effect of maleic hydrazide application on accumulation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured burley Tobacco. *J Agric Food Chem*, 1994, **42**(12): 2912 – 2916.
- [3] Hecht S S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol*, 1998, **11**, 559 – 603.
- [4] Bush L P, Hamilton J L, Davis D L. Chemical quality of burley tobacco modified by curing regime. *Tob Chem Res Con*, 1979, **33**: 10.
- [5] Burton H R, Childs G H, Anderson R A, *et al.* Changes in chemical composition of tobacco during senescence and curing Tobacco-specific nitrosamines. *J Agric Food Chem*, 1989, **37**(2): 426 – 430.
- [6] Tso T C. Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant. ed. Maryland: Ideals Inc Beltsville, 1990, 753.
- [7] Wiernik A, Christakopoulos A, Johansson L, *et al.* Effect of air-curing on the chemical composition of tobacco. *Rec Adv Tob Sci*, 1995, **21**: 39 – 80.
- [8] Burton H R, Dye N K, Bush L P. Relationship between tobacco-specific nitrosamines and nitrate from different air-cured tobacco varieties. *J Agric Food Chem*, 1994, **42**(11): 2007 – 2011.
- [9] John G H, Noel R K, Peter H, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Hecht S S, Orma R M, Hoffmann D. Determination of N-nitrosonor-nicotine in tobacco by high speed liquid chromatography. *Anal Chem*, 1975, **47**: 2046 – 2048.
- [12] 杨焕文, 李永忠, 刘彦中, 等. 烟草特有的 N-亚硝胺形成、积累及其影响因素. 烟草科技, 1998, **4**: 31 – 34.

Isolation and Identification of Endophytic Bacteria in Burley Tobacco and Reduction to TSNA Contents of Burley Tobacco

ZHU Ming-Liang^{1*} LI Tian-Fei² WANG An-Yun¹

(¹ Yunnan Tobacco Science Institute, Yuxi 653100, China)

(² Yuxi Hongta Tobacco Group Co. Ltd. Yuxi, 653100, China)

Abstract: By surface disinfection method, thirty three strains of endophytic bacteria were isolated from the midrib of thirty samples, including burley tobacco TN90 and TRM. These strains were identified as eight genera, they are *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Aerococcus*, and *Listeria*. The strains TEB11, TEB17, TEB23, TEB26, TEB30 and TEB34 were screened by nitrate and nitrite reducing test, and inoculated to burley tobacco leave by three methods: homogenized leave, dipped stalks and sprayed leave surface. The contents of NO₃N, NO₂N, TSNA and alkaloid of these samples cured were analyzed. The results showed that Endophytic bacteria could reduce 27.56% ~ 99.88% of the TSNA contents of burley tobacco leave, the TSNA contents of homogenized leave inoculated were lowest, then were dipped stalks and sprayed leave surface were highest.

Key words: Burley tobacco, Endophytic bacteria, Isolation, Identification, TSNA content

* Corresponding author. Tel: 86-877-2053302, Fax: 86-877-2051014, E-mail: mingliangzhu@hotmail.com

Received date: 11-18-2003