

一株源于醇化烟叶表面高效降解 TSNA 菌株 AS97 的分离筛选、鉴定及应用

单宏英¹, 陈德鑫², 李晶¹, 陈太春¹, 胡怀喜³, 郭志刚³, 安德荣^{1*}

¹西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

²中国烟草总公司青州烟草研究所, 青岛 266001

³陕西中烟工业有限责任公司, 西安 710000

摘要: 【目的】烟草特有亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines, 简称 TSNA)是烟叶中的主要致癌物质。本研究从筛选建立的特有菌库中发现了 1 株可有效降解 TSNA 的菌株 AS97, 并对其进行了鉴定及初步应用研究。【方法】采用富集驯化及选择培养基筛选得到硝酸盐与亚硝酸盐转化能力最强的菌株 AS97; 根据菌株的形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定; 并将 AS97 自制发酵液喷施于烟丝表面, 确定适宜接种量和发酵条件, 采用 LC-MS/MS(液相色谱串联质谱)方法检测 TSNA 中四种主要成分的含量。【结果】菌株 AS97 源于云南玉溪烤烟样品表面, 经分析确定其为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, GenBank 登录号: JF449445)。将 AS97 自制发酵液以 5% 的接种量喷施于烟丝, 30℃(相对湿度是 60%)条件下发酵 10 d 检测烟叶中硝酸盐、亚硝酸盐、TSNA、4-(N-甲基-亚硝基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)、N-亚硝基去甲基烟碱(NNN)、N-亚硝基新烟草碱(NAT)及 N-亚硝基假木贼碱(NAB)的转化率分别达到 68.77%、45.57%、45.47%、59.08%、38.79%、21.41% 及 11.76%。相关性分析结果表明烤烟中硝酸盐、亚硝酸盐与 TSNA 的含量均呈极显著相关($P > 0.01$), 进一步证实硝酸盐与亚硝酸盐是 TSNA 的主要前体物质。【结论】醇化烟叶表面的荧光假单胞菌 AS97 能够显著降低 TSNA 的含量。本文首次报道了源于醇化烤烟表面对 TSNA 有良好转化能力的 *Pseudomonas fluorescens*。可将其开发成新型微生物制剂, 应用于低害卷烟制品的生产实践中。

关键词: 醇化烟叶, 烟草特有亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines, 简称 TSNA), 菌株 AS97, 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*), 筛选鉴定

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2011)10-1326-08

在吸烟与健康问题不断深入的今天, 如何降低烟叶中有害物质的含量关乎着吸烟者的健康与烟草行业的可持续发展。烟草特有亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines, 简称 TSNA)是一组发现于烟

草中的主要致癌物质。TSNA 主要包括 4 种有害物质: 4-(N-甲基-亚硝基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 简称 NNK)、N-亚硝基去甲基烟碱(N-nitrosanicotine, 简

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA021503); 全国烟草有害生物调查研究(KJ-2010-04)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-29-87091812; E-mail: anderson323@163.com

作者简介: 单宏英(1987-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源利用研究。E-mail: 21-hy@163.com

收稿日期: 2011-03-05; 修回日期: 2011-06-08

称 NNN)、N-亚硝基新烟草碱(N-nitrosoanatabine, 简称 NAT)及 N-亚硝基假木贼碱(N-nitrosoanabasin, 简称 NAB)。其中 NNK 和 NNN 的含量最高,且具有显著的致癌作用。NNK 主要存在于烤烟中,而 NNN 主要存在于白肋烟中。大量的研究已证明 TSNA 的主要前体物质是烟叶中的硝酸盐、亚硝酸盐及氮氧化物,在微生物的作用下形成于调制时期^[1]。

目前国内外提出降低 TSNA 含量的方法主要包括控释氮肥、选育优良品种、改善烘烤工艺和调制方式、微波处理、沸石裂解及利用化学试剂等^[2]。但都存在一定的限制,难以确保实用性与安全性。在烟草生产和加工过程中,形成了特殊的微生物区系,利用醇化烤烟表面有益微生物降低烟叶中 TSNA 的含量是目前国内外烟草行业的重要研究热点之一。祝明亮等已对白肋烟中转化 TSNA 的微生物进行了较为深入的研究^[3-4],而醇化烟叶表面微生物资源的开发利用基本处于空白状态。我国尚未在生产实践中采用先进的生物技术发酵烟叶,达到有效降低烟叶中有害物质含量的目的。依据烤烟醇化发酵的特殊性,其表面能够转化 TSNA 的有益微生物被培养成优势菌群应用于卷烟生产实践,具有绿色环保的优点与广阔的开发前景。本研究首次采用选择培养基于醇化烤烟表面分离筛选能高效转化 TSNA 及其前体物质亚硝胺的优势菌株 AS97,确定了 AS97 的分类地位,并对菌株的生长条件及于卷烟生产实践中的应用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试醇化烤烟样品由陕西中烟工业有限责任公司提供;NNK、NNN、NAT 及 NAB 的标准样品均为加拿大 Toronto 公司产品(纯度不低于 98%);引物 PF21、PR1492、dNTP Mixture 为天根生化科技有限公司产品。

1.1.2 培养基^[5-7]:反硝化细菌培养基(DM1);溴百里酚蓝(BTB)选择性培养基;LB 培养基;TSA 培养基:胰胨 15.0 g,大豆蛋白胨 5.0 g,氯化钠 30.0 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.3 ± 0.2;改进 SM 富集培养基中用乙酸钠代替酒石酸钾钠;改进反硝化培养基(DM2):乙酸钠 10.0 g 代替酒石酸钾钠

20.0 g, KNO₃ 减少到 1.0 g,微量元素 2 mL,其余成分均同 DM1。

1.2 醇化烟叶表面细菌的富集分离筛选

为筛选得到目标菌株,分别采用了 3 种富集培养基和选择培养基。在含有 2 mL/L 微量元素的 LB、SM 及 DM1 培养基进行富集培养,即在无菌操作条件下将 5 g 烟叶样品加入装有 250 mL 灭菌的液体培养基中。150 r/min, 30℃ 培养 24 h 后,用移液枪吸取 2 mL 菌悬液加入到装有 150 mL 灭菌的液体培养基(均含有 1.0 g/L 的 KNO₃)中再次进行富集,24 h 后于 150 mL 灭菌的液体培养基(均含有 2.0 g/L 的 KNO₃)再重复 1 次。3 次富集驯化后,采用平板梯度稀释法,依次将 10⁻³~10⁻¹⁰ 8 个梯度涂布到 DM1、BTB 及 TSA 培养基(含有 2 g/L 的 KNO₃)中,30℃ 培养。待菌落长到大小适宜时,挑取形态不同的菌株于 BTB 平板上经 3 代纯化后,4℃ 保存于 TSA 斜面上,以上试验均设置 3 个重复。统计每种培养基及醇化烟叶样品中分离菌株的数目和种类,得到最优分离筛选培养基及各种醇化烟叶中目标微生物的分布概况。

1.3 具有硝酸盐及亚硝酸盐转化能力菌株的筛选

将初筛得到的形态不同的菌株于 TSA 培养基(含有 2 g/L 的 KNO₃)中划线活化,30℃ 培养 12 h。将菌株接种于装有 100 mL(含有硝酸盐为 1 g/L) DM2 培养基的 250 mL 三角瓶中,150 r/min, 30℃ 振荡培养。在 0 h、24 h、48 h 检测发酵液中硝酸盐含量变化,均重复 3 次。还原亚硝酸盐菌株的筛选同上。硝酸盐与亚硝酸盐的测定分别采用紫外分光光度法与 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法^[8]。

1.4 菌株 AS97 对烟叶中硝酸盐、亚硝酸盐及 TSNA 转化能力检测

菌株 AS97 于 TSA 培养基中 30℃ 活化 12 h,转接到自制接种液中(接种液配方:乙酸钠 9 g/L,蛋白胨 10 g/L,微量元素溶液 1 mL/L),30℃ 培养 12 h。将发酵液分装到灭菌喉头喷雾器中,根据血球计数法统计接种液中细菌个数^[9]。按 2%、5% 及 10% 的接种量分别喷施到 100 g 待处理烟丝样品上(玉溪 07 B4F-H2),混匀,装入无菌自封袋中,封口。分别于室温与 30℃(相对湿度是 60%)条件下发酵,设置未喷施发酵液烟叶为空白对照。以上操作均在无菌条件下进行,重复 3 次。观察记录发酵过程中样品基本特征变化情况,分别在 0 d(即空白)、2 d、

4 d、6 d、8 d、10 d时检测样品中硝酸盐、亚硝酸盐及 TSNA 的含量,并进行感官评吸。

1.5 硝酸盐、亚硝酸盐及 TSNA 成分检测方法 & 数据分析

硝酸盐、亚硝酸盐含量检测依据 Burton 等方法检测^[10-11];TSNA 中 4 种主要成分采用 LC-MS/MS (液相色谱串联质谱)方法检测^[12-15]。所有数据均采用 SPSS16.0 软件分析。

1.6 菌株 AS97 的鉴定

菌株 AS97 的形态特征及生理生化性状分析按照文献[16]进行。菌株 AS97 的 16S rRNA 基因序列测定分析参考文献[17-20]进行,以确定菌株的分类地位。

1.7 菌株 AS97 生长和培养条件测定

菌株 AS97 的生长曲线及温度、pH 值对菌株生长影响的测定参考文献[20]进行。

2 结果和分析

2.1 醇化烟叶表面有益细菌选择性分离初筛

经富集选择培养后,于 12 种醇化烟叶样品中共筛选得到 1279 株细菌。昆明 08C2F 与延安 07C3F-H 烟叶表面含有目标微生物种类和数目较多。昆明烟叶表面分离得到的微生物最多,达 365 株;延安及咸阳分别分离得到 189 株及 172 株;柳州醇化烟叶中仅得到 16 株。根据形态观察,在选择培养基中生长的菌株种类较少。SM + DM1 及 DM2 + BTB 培养基中分离得到的细菌种类最多,是筛选目标菌株的最佳组合。

2.2 高效转化硝酸盐及亚硝酸盐菌株的筛选

初筛得到的细菌中 53 株具有硝酸盐转化能力,61 株具有亚硝酸盐转化能力的菌株。其中 6 株菌同时具有转化二者的功能。AS97 是转化能力最强的菌株,24 h 对硝酸盐与亚硝酸盐的转化率分别达到 95.20% 及 92.93%。AS29 次之,均为较理想的目标菌株(图 1)。

2.3 菌株 AS97 对烟叶中硝酸盐、亚硝酸盐、TSNA 的转化率及相关性分析

菌株 AS97 于自制接种液中 30℃ 培养 12 h 后,采用血球计数法统计发酵原液中细菌浓度为 6.175×10^9 cfu/mL。2%、5% 及 10% 3 个接种量设置中,2% 接种量处理后,样品很快在室温和 30℃

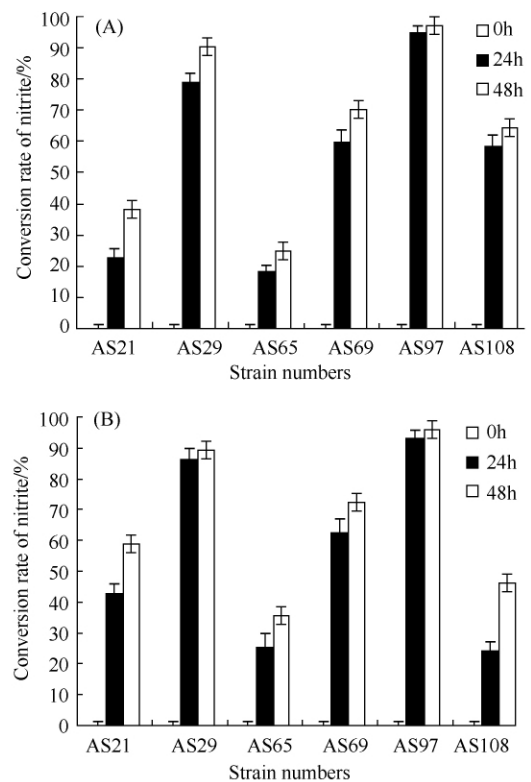


图 1 六株菌在 0 h、24 h 及 48 h 对硝酸盐与亚硝酸盐转化能力检测结果

Fig.1 Conversion rate of six beneficial microorganisms to nitrate and nitrite from 0 to 48 hours. A: Conversion rate of six beneficial microorganisms to nitrate at 0 h, 24 h and 48 h, respectively; B: Conversion rate of six beneficial microorganisms to nitrite at 0 h, 24 h and 48 h, respectively.

(相对湿度是 60%)条件下散失大部分水分,与空白对照相比几乎无任何变化,发酵不明显;10% 接种量过大,在室温和 30℃ (相对湿度是 60%)条件下,处理样品 2 d 时发生霉变;5% 接种量 30℃ (相对湿度是 60%)条件下,自封袋中样品会产生小部分热量,以此来断定处理样品在顺利进行发酵。

30℃ (相对湿度是 60%) 5% 接种量处理烟叶样品,10 d 中检测结果如表 2 所示,硝酸盐、亚硝酸盐及 TSNA 的转化率分别为 68.77%、45.57% 及 45.47%。相关性分析表明烤烟中硝酸盐、亚硝酸盐与 TSNA 的含量在 0.01 水平上均呈极显著相关(相关系数分别是 0.967 与 0.939),说明硝酸盐与亚硝酸盐是 TSNA 的主要前体物质。其中 NNK、NNN、NAT 及 NAB 分别降低了 59.08%、38.79%、21.41% 及 11.76% (表 1)。TSNA 转化率在 2 d - 4 d 时最高,表明菌株 AS97 能快速定植于醇化烟

叶上,并将烟叶中的氮氧化物作为生长必需的氮源,达到降低 TSNA 的目的。感官评吸结果表明 AS97 处理过的烟叶具有色泽桔黄油润,香气充

足,杂气和刺激性明显减轻,吸味醇和,生津感较好,劲头不变,余味较干净,陈烟气息显露,感官质量变好等优点。

表 1 30℃(相对湿度是 60%)条件下,5% 接种量对烟叶硝酸盐、亚硝酸盐及 TSNA 的转化率
Table 1 Under the condition of 30℃ and 60% relative humidity, degradation rate of nitrate, nitrite and TSNA with 5% AS97 inoculum concentration

Compounds (μg/g)	Fermentation time (d)						Degradation rate (%) ^a
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	
Nitrate	9992.57 ± 7.2501	7560.39 ± 7.5443	5423.89 ± 17.0436	4242.63 ± 3.5603	3665.01 ± 4.1154	3120.93 ± 9.5032	68.77 ± 0.1414A
Nitrite	6.21 ± 0.4200	5.05 ± 0.3686	4.52 ± 0.3308	3.90 ± 0.1528	3.56 ± 0.1332	3.38 ± 0.0252	45.57 ± 0.0919C
TSNA	2.11 ± 0.0557	1.80 ± 0.2517	1.57 ± 0.0100	1.45 ± 0.0351	1.25 ± 0.1411	1.15 ± 0.0252	45.47 ± 0.0153C
NNK	0.98 ± 0.0095	0.76 ± 0.0305	0.63 ± 0.0200	0.57 ± 0.0400	0.48 ± 0.0129	0.40 ± 0.0434	59.08 ± 0.6264B
NNN	0.82 ± 0.0156	0.78 ± 0.0737	0.65 ± 0.0403	0.61 ± 0.0156	0.53 ± 0.0252	0.50 ± 0.0150	38.79 ± 0.6964D
NAT	0.29 ± 0.0114	0.27 ± 0.0503	0.27 ± 0.0501	0.25 ± 0.0291	0.24 ± 0.0204	0.23 ± 0.0169	21.41 ± 0.5027E
NAB	0.02 ± 0.0044	0.02 ± 0.0219	0.02 ± 0.0106	0.02 ± 0.0153	0.02 ± 0.0100	0.02 ± 0.0055	11.76 ± 0.5220F

^aThe capital letters represent the significance level at 1%.

2.4 菌株 AS97 的鉴定

AS97 在 TSA 培养基上生长良好,圆形菌落隆起,乳黄色,有光泽,透明,边缘整齐向外扩展,表面较湿润,有一定的粘稠度,易用接种针挑起,254 nm 紫外灯斜光照射下可见黄绿色荧光。电镜观察菌体大小为 (0.7 - 0.8) μm × (1.5 - 2.0) μm,杆状,革兰氏阴性,运动,不产生芽孢和荚膜,丛生极毛。菌株 AS97 的生理生化特征如表 2 所

示。将测得的 1400 bp 序列,在国际核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行同源序列比对,AS97 与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的基因序列同源性高达 100%。综合 AS97 的形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析,确定菌株 AS97 为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (GenBank 登录号为:JF449445)。

表 2 菌株 AS97 的生理生化特征
Table 2 Biochemical and physiological characteristics of strain AS97

Characteristics	Strain AS97 ^a	Characteristics	Strain AS97 ^a
Cell shape	Rods	L-arabinose	+
Cell size (μm)	0.7 - 0.8 × 1.5 - 2.0	Decomposition of:	
Flagellum	> Single and clusters	Nitrate	+
Gramstaining	-	Citrate	+
Hydrolysis of:		Propionate	-
Gelatin	+	Enzyme ctivity:	
Starch	+	Oxidase	+
Gelatin	-	Lipase	+
Tween 80	-	Arginine dihydrolase	+
Tween 60	-	PHB accumulation	-
Extracellular PHB	+	Yellow orange cytochrome	-
Acid production from:		Optimum temperature (°C)	30
D-glucose	+	Temperature Range (°C)	10 - 50
Sucrose	+	Optimum pH	7
Lactose	+	pH Range	4 - 10

^a“+” represents positive reactions, “-” represents negative reactions.

2.5 菌株 AS97 生长条件初步研究

由图 2 可知菌株 AS97 约在 8 h 达到对数生长期,表明菌株适应能力强,生长旺盛,繁殖速度快。20 h 达到最大生长量,菌体浓度最高,菌株生长处于

稳定期,与菌株对硝酸盐的转化速度保持一致。培养 42 h 时进入衰亡期,同时 AS97 对硝酸盐的利用速度亦逐渐减缓。但菌株在整个生长过程中均保持着对硝酸盐的利用。菌株 AS97 在 10℃ - 50℃、

pH 3.0 – 11.0 的范围内均可生长。AS97 最适生长温度是 30℃、pH7.0, 此时菌体浓度最高, 对硝酸盐的利用速度亦最快(图 3, 图 4)。

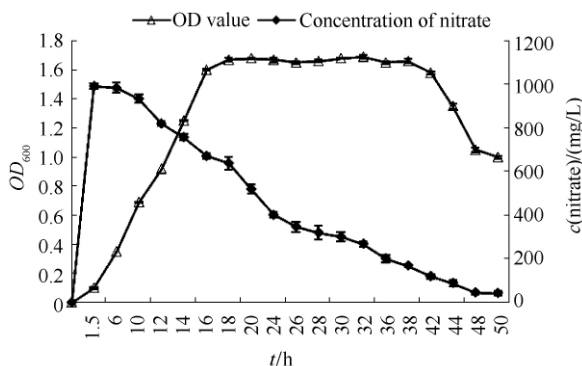


图 2 菌株 AS97 的生长曲线及硝酸盐转化能力

Fig.2 The growth curve and nitrate converting ability of AS97.

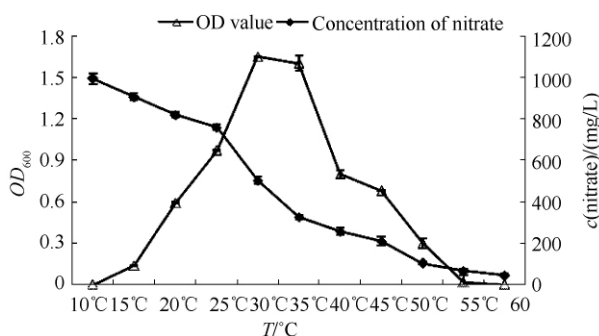


图 3 温度对菌株 AS97 生长及硝酸盐转化能力的影响

Fig.3 The influence of temperature on growth and nitrate conversion of AS97.

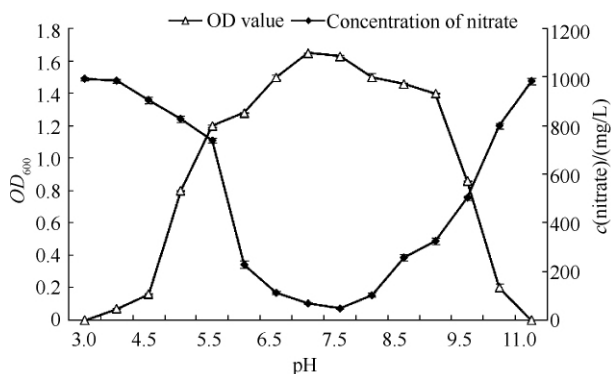


图 4 pH 值对菌株 AS97 生长及硝酸盐转化能力的影响

Fig.4 The influence of pH on the growth and nitrate conversion of AS97.

3 结论和讨论

富集初筛是以硝酸盐作为唯一氮源, 对目标微生物的一种驯化培养。醇化烟叶表面初筛得到的菌株种类较少, 可能是因连续 3 次富集驯化及选择性培养抑制了大部分微生物的生长。本研究中首次采用不同富集驯化与初筛培养基组合分离筛选目标微生物, 确定最佳初筛培养基是 SM + DM1 和 DM2 + BTB。高效降解亚硝酸胺类物质的菌株 AS97 和 AS29 分别是通过以上两种培养基组合分离得到。依据好氧反硝化细菌的生长特性^[5], 改进 SM 和 DM2 培养基中碳源组份均为乙酸钠。BTB 选择性培养基在配制时需严格控制 pH7.0, 因酸碱性条件下, 培养基颜色分别是绿色与蓝色。同于爱茸^[21]等报道相符, 此培养基现象易辨别, 且易分离到硝酸盐转化率高的菌株。

不同等级与醇化时间烟叶表面微生物的种类和数量存在差异。优质烟叶表面微生物种类多于劣质烟叶; 烟叶醇化时间愈短, 微生物种类愈多。试验结果符合 Michele 等的报道^[22-25]。醇化烟叶表面微生物的多样性可能由烟叶品种、品质、醇化时间及环境条件共同决定。

汪安云等^[26]根据颜色变化确定菌株转化硝酸盐的能力, 可能因为发酵液中硝酸盐含量大于显色方法的适用范围, 在实际操作中常因颜色变化过快, 难以准确判别。张玉芹等^[27]采用 Giltay 方法检测反硝化菌株的产气特性, 分离得到的目标菌株具有显著的厌氧特征, 其应用受到限制, 导致转化 TSNA 能力较差。本研究中复筛采用紫外分光光度法检测硝酸盐及亚硝酸盐转化能力, 此定量检测方法科学可靠。因此菌株转化硝酸盐与亚硝酸盐的检测分析宜采用紫外分光光度法。

与邵晴^[28]等报道的好氧反硝化细菌在稳定生长期基本停止对硝酸盐转化的结论不符, 菌株 AS97 在生长过程中一直保持着对氮源的有效利用。可能是由于 AS97 的生长繁殖速度快, 对硝态氮的利用能力较强所致。本研究确定菌株最佳接种量、培养温度及 pH 值分别是 5%、30℃ (相对湿度 60%) 及 7.0, 因发酵受到多种因子的控制, AS97 喷施烟叶后的最佳发酵条件需要进一步的研究和探索。

TSNA 的国标检测方法是气象色谱配热能自动

分析仪(GC/TEA)。Burton 等^[10]在早期即采用热能自动分析仪检测烟草中含有的微量亚硝胺类物质。但 TEA 维护费昂贵,程序复杂,目前国内能独立完成检测的单位很少。近年来随着色谱技术的发展,LC/MS-MS 及 GC/NDP 检测法也得到一定的推广和应用,Dominique 及 Rickert 等^[13-14]均已成功采用 LC/MS-MS 法检测到了 TSNA。本试验中即采用 LC/MS-MS 法检测烟叶中 TSNA 的含量,并成功检测到含量极微的 NAB 及 NAT。此方法回收率与重复率均较高,检测精确,易于操作,是目前 TSNA 较为理想的检测方法之一。

烟叶中主要致癌物质 NNK 和 NNN 的含量显著降低,表明菌株 AS97 对亚硝胺类物质具有稳定高效的降解能力。相关性分析与 Burton 等^[10]报道一致,烤烟中硝酸盐、亚硝酸盐与 TSNA 的含量($P > 0.01$)呈极显著相关。即醇化烟叶中硝酸盐与亚硝酸盐是 TSNA 的主要前体物质,为 TSNA 的形成途径进一步奠定了理论基础。

1999 年英国 Star Scientific, Inc. 研发出一种有效阻止 TSNA 形成的调制技术,已成功应用于白肋烟的生产。其原理可能是在烟叶调制过程中通过特殊无氧处理与微波灭菌技术,杀死微生物^[1],在不影响烟草品质的同时,达到减少或防止 TSNA 形成的目的。本研究在醇化烟叶表面筛选亚硝胺类物质转化率高的优势菌株,施用于调制烤烟中,降低 TSNA 的含量。其试验原理同 Star Scientific, Inc. 相似,也进一步说明 TSNA 的形成离不开微生物与亚硝胺类物质的相互作用。

白肋烟中分离得到的内生细菌 *Agrobacterium tumefaciens* 对 TSNA 有较强转化能力^[22],本研究首次于云南玉溪醇化烟叶表面分离筛选到对 TSNA 有显著转化能力的菌株 AS97 *Pseudomonas fluorescens*。这与 Chen 和邱立友等^[29-30]关于假单胞菌是醇化烟叶表面微生物的优势菌群,且具有转化 TSNA 潜力的报道相符。由此推断因白肋烟与烤烟栽培和调制方式存在的差异,导致其表面优势微生物类群亦存在一定差异。硝酸盐转化率高的混菌悬液可能是降低烟叶中有害物质的更佳途径。菌株 AS97 转化 TSNA 的生物活性可以通过改变发酵条件、共培养、理化诱变及分子生物学技术等得到提高。

醇化烟叶表面微生物资源具有较大的应用潜力。高效转化 TSNA 菌株 AS97 的分离筛选、鉴定及

初步应用研究,填补了国内醇化烟叶表面微生物资源开发的空白。为充分利用醇化烟叶表面减害微生物提供了理论及技术依据。

参考文献

- [1] 祝明亮,雷丽萍. 烟草微生物学. 北京:科学出版社, 2008: 137-139
- [2] 雷丽萍. 烟草内生芽孢杆菌降低烟叶亚硝胺类物质含量的研究. 西南农业学报 (*Southwest China Journal of Agricultural Sciences*), 2007, 20(3): 515-520
- [3] 祝明亮,李天飞,汪安云. 白肋烟内生细菌的分离鉴定及降低 N-亚硝胺含量的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 4(44): 422-426
- [4] 汪安云. 细菌对白肋烟叶片硝酸盐、亚硝酸盐和烟草特有亚硝胺含量的影响. 中国烟草学报 (*Tobacco Science & Technology*), 2007, 13(4): 45-49
- [5] 安健,宋增福,杨先乐. 好氧反硝化芽孢杆菌筛选及其反硝化特性. 环境科学研究 (*Research of Environmental Sciences*), 2010, 23(1): 101-105
- [6] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources. *Water Science and Technology*, 2004, 50(8): 15-22.
- [7] 何方,康怡军,单君. 一株高耐氧反硝化细菌的筛选及其反硝化产物确定. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2008, 35(1): 35-39
- [8] 黄进. 环境监测实验. 成都:四川大学出版社, 2010: 42-46
- [9] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术. 西安:世界图书出版公司, 2000: 52-54
- [10] Burton HR, Childs GH, Anderson RA, Fleming PD. Changes in chemical composition of tobacco during senescence and curing Tobacco-specific nitrosamines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, 37(2): 426-430
- [11] 刘文峰,王元英,邱军. 烤烟中硝酸盐和亚硝酸盐的测定. 中国烟草学报 (*Tobacco Science & Technology*), 2001(7)4: 13-16
- [12] 虞苏行,胡念念,戴云辉. LC-MS/MS 法检测卷烟滤嘴截留的烟气 TSNA_s. 烟草科技 (*Tobacco Science & Technology*), 2008, 257(12): 42-46
- [13] Dominique K, Gerhard S, Michael U, Francis C, Graham E, Jim S, Mike M. Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines (TSNA) in human urine. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877: 1185-1192

- [14] Rickert WS , Joza PJ , Sharifi M , Wu J. Reductions in the tobacco specific nitrosamine (TSNA) content of tobaccos taken from commercial Canadian cigarettes and corresponding reductions in TSNA deliveries in mainstream smoke from such cigarettes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* , 2008 , 51 : 306-310
- [15] Agner KA , Finkel NH. Development of a quantitative method for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke using isotope dilution liquid chromatography/electro spray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* , 2005 , 77 : 1001-1006
- [16] 东秀珠 ,蔡妙英. 常见细菌鉴定系统手册. 北京: 科学出版社 , 2001 : 162-171
- [17] Garrity GM , Bell JA , Lilbum. TG Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology* , New York : Springer , 2001
- [18] Wang YN , Cai H , Yu SL. *Halomonas gudaonensis* sp. nov. , isolated from a saline soil contaminated by crude oil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2007 , 57 : 911-915
- [19] Catia AC. Miranda OB. Martins. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical , 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* , 2008 , 93 : 297-304
- [20] 沈萍 ,陈向东. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社 , 2008 : 85-97 , 141-157
- [21] 于爱茸 ,李尤 ,俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究. *微生物学杂志 (Journal of Microbiology)* , 2005 , 25 (3) : 77-81
- [22] Zhao MQ , Wang BX , Li FX , Qiu LY , Li FF , Wang SM , Jike C. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2007 , 73 : 1435-1440
- [23] Michele DG , Marianna P , Daniele S , Giovanni V , Francesco I , Paolo V , Pietro A , Dino P. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 : 825-837
- [24] 刘萍 ,张广民 ,郑小嘎 ,张修国. 烟叶表面微生物及其作用. *微生物学通报 (Microbiology China)* , 2003 , 30 (6) : 105-110
- [25] 王玥 ,谢响明 ,雷丽萍 ,夏振远. 烟叶调制过程中细菌种群多样性分析. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)* , 2009 , 25 (1) : 20-24
- [26] 汪安云 ,黄琼. 一株降低烟草中特有亚硝胺细菌的分离鉴定及特性研究. *环境科学学报 (Journal of Environmental Sciences)* , 2006 , 26 (11) : 1914-1920
- [27] 张玉芹 ,刘开启 ,王革 ,陈静 ,潘好芹. 反硝化细菌的筛选及培养条件的研究. *农业环境科学学报 (Journal of Agro-Environment Science)* , 2005 , 24 (1) : 165-168
- [28] 邵晴 ,余晓斌. 好氧反硝化细菌的筛选及反硝化特性研究. *生物技术 (Biotechnology)* , 2008 , 18 (3) : 63-65
- [29] Chen CM , Li XM , Yang JK , Gong XW , Li B , Zhang KQ. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22 , and its potential application in tobacco processing. *International Biodeterioration & Biodegradation* , 2008 , 62 : 226-231
- [30] 邱立友 ,赵铭钦 ,岳雪梅 ,齐伟城 ,张维群. 自然发酵烤烟叶面微生物区系的分离鉴定. *烟草科技 (Tobacco Science & Technology)* , 2000 , (3) : 14-17

Identification and primary application of TSNA degrading bacterial strain AS97 isolated from aging tobacco leaves

Hongying Shan¹, Dexin Chen², Jing Li¹, Taichun Chen¹, Huaixi Hu³, Zhigang Guo³,
Derong An^{1*}

¹ College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

² Qingzhou Tobacco Research Institute of China National Tobacco Crop, Qingdao 266001, China

³ China Tobacco Shaanxi Industrial CO. LTD, Xi'an 710000, China

Abstract: [Objective] The purpose of this work was to screen strains having tobacco-specific nitrosamines (TSNA) deteriorating activity, isolated from the inner and superficial of tobacco plants. Then strain AS97 was isolated and identified for further application. [Methods] Strain AS97, with the highest conversion ability against both nitrate and nitrite, was screened by enrichment and selective medium. The strain was identified by morphological, physio-biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The concentration of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), N-nitrosonicotine (NNN), N-nitrosoanatabine (NAT) and N-nitrosoanabasine (NAB) were determined by LC-MS/MS. The fermentation broth of strain AS97 was sprayed on the leaves of tobacco to define inoculum concentration and fermentation condition. [Results] AS97 was identified as *Pseudomonas fluorescens* (Genbank accession number: JF 449445). Under the optimal growth conditions with inoculum concentration of 5%, at 30°C for 10 d, AS97 had high biological activity against NNK and NNN with a degradation rate of 59.08% and 38.79%, respectively. The correlation analysis displayed a pronounced correlation ($p > 0.01$) among the concentration of nitrate, nitrite and TSNA. Furthermore, the results also exhibited that nitrate and nitrite were antecedent substance of TSNA. [Conclusion] These results indicated that *Pseudomonas fluorescens* AS97 could be a promising microorganism in the practice of non-harmful cigarette production.

Keywords: aging tobacco, tobacco-specific nitrosamines (TSNA), strain AS97, *Pseudomonas fluorescens*, isolation and identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA021503) and by the National Tobacco Pests Survey (KJ-2010-04)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87091812; E-mail: anderong323@163.com

Received: 15 March 2011/Revised: 8 June 2011