

一株尼古丁降解菌株 *Arthrobacter* sp. D4 的分离鉴定及其降解代谢途径

邓帅军^{1,2}, 张鸽³, 刘德水⁴, 貂志杰^{1,2}, 史素娟⁴, 李志豪⁵, 马莉⁴, 刘晓晖⁶, 张海波³, 刘好宝^{*1}, 王倩^{*1}

1 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 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101

4 上海烟草集团有限责任公司技术中心北京工作站, 北京 101121

5 湖北省烟草公司宜昌市公司, 湖北 宜昌 443000

6 深圳烟草工业有限责任公司, 广东 深圳 518000

邓帅军, 张鸽, 刘德水, 貂志杰, 史素娟, 李志豪, 马莉, 刘晓晖, 张海波, 刘好宝, 王倩. 一株尼古丁降解菌株 *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

Deng Shuaijun, Zhang Ge, Liu Deshui, Mo Zhijie, Shi Sujuan, Li Zhihao, Ma Li, Liu Xiaohui, Zhang Haibo, Liu Haobao, Wang Qian. Isolation, identification, degradation pathway prediction of a nicotine-degrading strain *Arthrobacter* sp. D4[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3644-3656

摘要:【背景】烟草在生产和加工中会产生高浓度的尼古丁废弃物, 对环境造成较大的污染。

【目的】筛选降解尼古丁的微生物菌种并解析其降解尼古丁的代谢途径, 理解微生物如何降解尼古丁。【方法】用常规分离筛选方法、结合形态学观察和分子鉴定手段分离和鉴定菌株类别, 进而利用单因素试验方法, 通过设置不同的尼古丁浓度、温度和 pH 确定菌株降解尼古丁的最适发酵条件和降解率, 利用气相色谱-质谱联用技术检测菌株在尼古丁降解过程中的主要代谢产物。【结果】获得一株以尼古丁为唯一碳源和氮源的节杆菌属(*Arthrobacter*)菌株, 编号为 D4; 该菌株降解尼古丁的最适温度和 pH 分别为 30.0 °C 和 7.0; 在 1 g/L 的尼古丁浓度下具备较快的尼古丁降解速率, 培养 18 h 时尼古丁降解率可达到 90%以上; 尼古丁浓度 \geq 4 g/L 时菌株生长受到明显抑制; 与目前报道的节杆菌属降解途径不同, 该菌株降解尼古丁过程中产生了新的终产物 N-甲基吡咯烷酮、可替宁及中间产物麦斯明。【结论】本研究分离鉴定到一株具有较快尼古丁降解速率的节杆菌, 该菌株很可能存在新的尼古丁降解途径。

基金项目: 中国农业科学院烟草研究所横向项目(K2022-2-002P); 国家自然科学基金(32170387)

Supported by: Project of Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences (K2022-2-002P); National Natural Science Foundation of China (32170387)

*Corresponding authors: E-mail: LIU Haobao: liuhaobao@caas.cn; WANG Qian: wangqian01@caas.cn

Received: 2022-01-19; Accepted: 2022-02-24; Published online: 2022-03-22

关键词: 尼古丁降解; 节杆菌属; 代谢产物; 降解途径

Isolation, identification, degradation pathway prediction of a nicotine-degrading strain *Arthrobacter* sp. D4

DENG Shuaijun^{1,2}, ZHANG Ge³, LIU Deshui⁴, MO Zhijie^{1,2}, SHI Sujuan⁴, LI Zhihao⁵, MA Li⁴, LIU Xiaohui⁶, ZHANG Haibo³, LIU Haobao^{*1}, WANG Qian^{*1}

1 Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

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

3 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China

4 Beijing Branch, Technology Center, Shanghai Tobacco Group Limited Company, Beijing 101121, China

5 Yichang Branch of Hubei Tobacco Company, Yichang 443000, Hubei, China

6 Shenzhen Tobacco Industry Limited Company, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: [Background] High concentrations of nicotine waste are generated during the production and processing of tobacco, causing serious environmental pollution. [Objective] The purpose of this study is to screen out the microbial strain capable of degrading nicotine, and analyze the metabolic pathways of the strain in nicotine degradation. [Methods] We employed the conventional method for strain isolation and identified the target strain based on morphological characteristics and molecular evidence. The fermentation conditions including nicotine concentration, temperature, and pH were optimized by single factor tests with degradation rate as the indicator. The main metabolites of the strain in nicotine degradation were detected by gas chromatography-mass spectrometry. [Results] *Arthrobacter* sp. D4 was isolated, which could utilize nicotine as the sole carbon and nitrogen source. The optimal conditions of the strain for degrading nicotine were 30.0 °C, pH 7.0, and nicotine concentration of 1 g/L, under which the degradation rate reached 90% within 18 h. The growth of the strain was significantly inhibited when the concentration of nicotine in the culture medium was greater than or equal to 4 g/L. Subsequent experiments revealed that the strain produced new end-products N-methylpyrrolidone and cotinine and the intermediate product myosmine, which were different from the reported degradation pathway of *Arthrobacter* sp. [Conclusion] In this study, an *Arthrobacter* sp. strain characterized by fast nicotine degradation was isolated and identified. Moreover, this strain may have a new nicotine degradation pathway.

Keywords: nicotine degradation; *Arthrobacter*; metabolic product; degradation pathway

尼古丁是由一个吡啶环和一个氢化吡咯烷环构成的生物碱,是烟草中含量最多的一种生物碱,约占烟草总生物碱含量的 95%和烟草干重的 1.5%^[1]。收获后的烟叶在晾制、调制、陈化、发酵、燃吸等过程中,尼古丁都会形成和积累具有强致癌性的烟草特有亚硝胺(tobacco-specific

N-nitrosamines, TSNAs)^[2]。烟叶在使用过程中会产生一定浓度的水溶性的尼古丁固体和液体废弃物^[3],这些废弃物中尼古丁的平均含量为 18 g/kg^[4],远超欧盟控制标准规定的 0.5 g/kg,被认为是有毒和有害物质^[5],易对空气、土壤和水体造成污染^[6]。在医学上,尼古丁具有高毒性,

会对生殖系统和一些器官如肺、胃、肝等造成伤害^[7]。因此,尼古丁降解有效方法的开发迫在眉睫。

目前降低烟叶尼古丁技术大致分为三类:

(1) 农业技术。例如选育尼古丁含量适宜的品种或将烟叶生产向生态最适宜区转移等^[8-10]。(2) 物理化学技术。例如光催化降解或利用吡啶乙酸、赤霉素、抗坏血酸和生育酚喷洒烟叶等^[9,11]。(3) 微生物和酶技术。即利用能够有效降解尼古丁的微生物和酶制剂处理烟叶^[12]。由于农业技术存在育种时间长、操作烦琐等问题,而物理化学技术所需处理成本高且对环境有害,微生物法降解尼古丁被认为是一种较经济、有效和环境友好的手段^[13-14]。

当前已报道的微生物降解尼古丁的途径主要有4种:(1) 吡啶降解途径。代谢产物主要有6-羟基尼古丁、6-羟基-N-甲基麦斯明、2,6-二羟基假氧化尼古丁、2,6-二羟基吡啶和尼古丁蓝等,节杆菌属(*Arthrobacter*)多以此途径为主^[15]。(2) 吡咯降解途径。代谢产物主要有N-甲基麦斯明、假氧化尼古丁、3-琥珀酰吡啶、2,5-二羟基吡啶等,假单胞菌属(*Pseudomonas*)多以此为主^[16]。(3) 多在真菌体内发现的脱甲基降解途径。代谢产物主要有去甲基尼古丁、麦斯明、N-甲基烟酰胺和2,3-联吡啶等^[17]。(4) 在部分菌株中发现的吡啶和吡咯交叉降解途径。如 *Agrobacterium tumefaciens* S33、*Ochrobactrum* sp. SJY1 和 *Shinella* sp. HZN7, 主要代谢产物为6-羟基尼古丁、6-羟基-N-甲基麦斯明和2,5-二羟基吡啶等^[18-21]。其中,尼古丁降解途径的研究多集中于假单胞菌属和节杆菌属^[22]。在降解途径多样性研究方面,与假单胞菌属报道的7条吡咯途径相比,节杆菌属中只报道了2条^[16,23],即一条吡啶降解途径和目前仅在菌株 *Arthrobacter*

sp. aRF-1 中发现的一条吡啶和吡咯交叉降解途径。这同时也表明节杆菌属可能存在2种以上的尼古丁代谢途径^[3]。因此,挖掘高效的尼古丁降解菌株并明确其降解途径,可更好地判断菌株在尼古丁环境污染去除中的应用前景。

因此,本研究通过筛选降解尼古丁的微生物菌种,进而鉴定高效菌株并解析其降解尼古丁的代谢途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

土壤样品来自云南、陕西、山东三地植烟土壤混样;尼古丁(96%),陕西昊辰生物科技有限公司;试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,无根生化科技有限公司; *Taq* Master Mix (2×)聚合酶,诺唯赞生物科技股份有限公司。

尼古丁液体培养基配制方法参考文献[24]。尼古丁固体培养基:以尼古丁液体培养为基础添加1.5%的琼脂粉。

LB培养基(g/L):蛋白胨10.0, NaCl 10.0, 酵母提取物5.0。

1.2 方 法

1.2.1 尼古丁降解菌的初筛和复筛

取混合样土壤5g加入含100 mL 1 g/L 尼古丁液体培养基中,在37 °C恒温摇床中200 r/min培养48 h后,进行梯度稀释并涂布于尼古丁固体培养基上,在37 °C恒温箱中培养48 h,挑取单个菌落在尼古丁液体培养基中37 °C、200 r/min发酵48 h,分别测定其尼古丁降解率。在相同培养条件下,在所筛菌株中菌株D4具有最大的尼古丁降解效率,选取此菌株进行后续实验。

1.2.2 菌株D4的鉴定和表征

菌株D4的生理生化实验根据《伯杰氏细

菌鉴定手册》^[25]进行。细胞形态使用冷场发射扫描电子显微镜观察。菌株 D4 基因组 DNA 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒获得。使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 对菌株 D4 的 16S rRNA 基因序列进行 PCR。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 1 μ L, 上游引物 27F (10 pmol/L) 2 μ L, 下游引物 1492R (10 pmol/L) 2 μ L, *Taq* Master Mix (2 \times)聚合酶 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物由北京擎科生物科技有限公司完成测序。所获序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 利用 MEGA 7.0 软件中 neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.2.3 菌株 D4 在不同条件下的尼古丁降解能力测定

为分析菌株 D4 降解尼古丁的最适条件, 利用单因素试验对培养体系中的尼古丁浓度、pH 和培养温度进行研究。将菌株 D4 以 1% 的接种量分别接种于尼古丁含量为 1、2、3、4、5 g/L 的尼古丁液体培养基中进行培养, 培养条件为 37.0 $^{\circ}$ C、pH 7.0、200 r/min。每隔 6 h 取样测定菌体生长量, 并在 18 h 时测定不同尼古丁浓度下的降解率。为探究培养温度对菌株 D4 尼古丁降解的影响, 分别设置 26.5、30.0、33.5、37.0 和 40.5 $^{\circ}$ C 这 5 个培养温度, 在 18 h 时测定不同温度下的尼古丁降解率。为探究培养基初始 pH 值对菌株 D4 尼古丁降解的影响, 设置培养基 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 这 5 个梯度, 在 18 h 时测定不同 pH 下的尼古丁降解率。每个实验设 3 个生物学重复。

1.2.4 尼古丁-吸光度标准曲线的制定和发酵液中尼古丁含量的测定

用 0.05 mol/L 的 HCl 作为溶剂分别配制

0.005、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030 g/L 的尼古丁标准溶液, 以 0.05 mol/L 的 HCl 溶液为参比溶液调零, 在 259 nm 处记录吸光值。横坐标设定为尼古丁浓度, 纵坐标设定为吸光度。在测定范围内, 尼古丁浓度和吸光值成正相关关系, 回归方程为 $y=39.5x-0.004$, $R^2=0.9995$ 。

发酵液中尼古丁含量测定: 在 7 378 \times g 条件下离心 5 min 去除菌体, 测定上清液中的吸光度值来计算尼古丁降解率。计算公式: 尼古丁降解率=(初始尼古丁含量-剩余尼古丁含量)/初始尼古丁含量 \times 100%, 含量单位为克(g)。

1.2.5 菌株 D4 尼古丁降解中间代谢产物的测定

分离纯化的 D4 菌株接种到 3 mL 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 转接到 50 mL 的 LB 液体培养基中培养 3-4 h, 取 8 mL 菌液在 4 $^{\circ}$ C、1 844 \times g 条件下离心 10 min, 去除上清液, 无菌生理盐水洗涤 3 次。用 1.5 mL 生理盐水悬浮菌体, 取 1 mL ($OD_{600}=7.19$)加入 1 g/L 的尼古丁液体培养基中。分别取 4 mL 颜色变化明显时的尼古丁培养基, 即无色(阶段 1, 未接种菌体)、蓝色(阶段 2, 发酵 12 h)、墨绿色(阶段 3, 发酵 18 h)、浅黄色(阶段 4, 发酵 24 h), 于 4 $^{\circ}$ C、1 844 \times g 离心 10 min 去除菌体, 冷冻干燥后, 用 2 mL 无菌水重新溶解(甲醇不全溶), 过 0.22 μ m 水相膜后, 用气相色谱-质谱联用 (GC-MS)测定物质。

色谱条件: HP-INNOWAX 色谱柱(30 m \times 250 μ m \times 0.25 mm); 载气 He; 载气流速 1.0 mL/min; 进样口温度 250 $^{\circ}$ C; 升温程序 40 $^{\circ}$ C, 保持 2 min, 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C; 分流模式, 分流比 5:1。质谱条件: EI 离子源; 电离能量 70 eV; 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 四极杆温度 150 $^{\circ}$ C; 采集模式全扫描; 质量扫描范围 40-400 amu。采集完的数据, 经过 GC-MS Chemstation 软件定性处理, 检索谱库为 NIST08 谱库。

1.2.6 数据分析

数据平均值和标准偏差使用 Microsoft Excel 2019 计算。单方面分类方差分析使用 SAS 9.4 软件运算 Duncan 法。利用 Origin 9.0 作图分析。

2 结果与分析

2.1 尼古丁降解菌株的分离和鉴定

按照菌株常规分离筛选方法, 经过初筛, 从土壤中筛选到具有降解尼古丁功能的菌株 16 株。经过发酵后, 对 16 株菌发酵液的尼古丁含量进行测定。结果表明, 编号为 D4 的菌株具有最大的尼古丁降解率, 因此选择该菌株做后续研究。菌株 D4 是一种需氧的革兰氏阳性细菌, 细胞呈不规则的杆状, 长度为 1.8–8.0 μm 。生长过程中, 菌体由杆状断裂成直径为 0.6–1.0 μm 的小球状(图 1A)。该菌株在 LB 平板上的菌落形态为圆形, 凸起, 乳黄色, 不透明, 边缘光滑(图 1B), 在 1 g/L 尼古丁固体培养基中会先产生蓝色物质, 后蓝色转变为黄色(图 1C)。菌株的生理生化特性见表 1, 菌株 D4 可以利用淀粉、

葡萄糖和乳糖, 能还原硝酸盐生成亚硝酸盐, 甲基红试验、V-P 试验、明胶液化试验、苯丙氨酸脱氨酶试验和甘露醇发酵试验结果均为阴性。根据上述形态和生理生化特征, 初步鉴定该菌株属于节杆菌属(*Arthrobacter*)。

16S rRNA 基因序列测定和 BLAST 同源性比对分析表明, 菌株 D4 与多个 *Arthrobacter* 的 16S rRNA 基因序列相似度均在 99% 以上, 因此确定菌株 D4 为节杆菌属(*Arthrobacter*)。菌株 D4 16S rRNA 基因的系统发育树见图 2。

2.2 不同实验条件下菌株 D4 的尼古丁降解能力分析

2.2.1 菌株 D4 在不同尼古丁浓度下的生长曲线及培养 18 h 时的尼古丁降解率

为明确菌株 D4 在不同尼古丁浓度培养基中的生长情况, 将其以 1% 接种量分别接种于尼古丁含量为 1、2、3、4、5 g/L 的尼古丁液体培养基中进行培养(37.0 $^{\circ}\text{C}$)。结果表明, 在 1 g/L 尼古丁浓度下, 培养 18 h 时即达到最大生长量; 相较于 1 g/L 浓度, 菌株 D4 在 2 g/L 和 3 g/L 的尼古丁浓度下分别向后延迟 12 h 和 30 h 达到最大

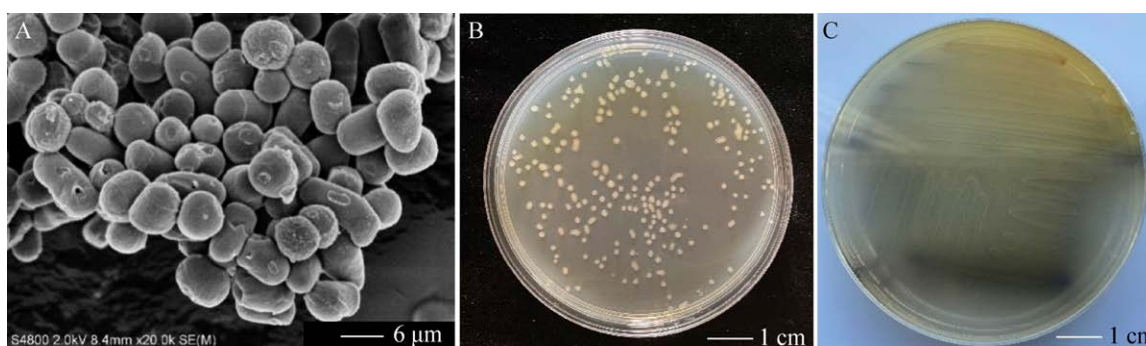


图 1 菌株 D4 的菌体和菌落形态 A: 菌株的扫描电镜形态, 标尺=6 μm ; B: 菌株在 LB 平板培养中的形态(37.0 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h), 标尺=1 cm; C: 菌株在 1 g/L 尼古丁平板培养中的颜色(37.0 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h), 标尺=1 cm

Figure 1 Bacteriophage and colony morphology of strain D4. A: Scanning electron microscope morphology of the strain (12 h incubation at 37.0 $^{\circ}\text{C}$), scale bar=6 μm ; B: Morphology of the strain in LB plate culture, scale bar=1 cm; C: Color observation of the strain in 1 g/L nicotine plate culture (18 h incubation at 37.0 $^{\circ}\text{C}$), scale bar=1 cm.

表 1 菌株 D4 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain D4

| 测试项目 Test item | 结果 Result |
|----------------------------------|--------------|
| Gram stain | + |
| Methyl red | - |
| V-P test | - |
| Amylolysis | + |
| Glucose | + |
| Lactose | + |
| Anaerobic growth | - |
| Nitrate reduction | + |
| Gelatin liquefaction | - |
| Phenylalanine | - |
| Mannitol fermentation | - |
| 3% H ₂ O ₂ | + |

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

生长量, 表明在这 2 个尼古丁浓度下, 菌株 D4 生长受到抑制; 在 4 g/L 和 5 g/L 尼古丁浓度下, 菌株生长明显受到抑制, 尤其在 5 g/L 浓度下, 菌株生长受到完全抑制(图 3A)。因此, 为确保

菌株生长不受到抑制, 在后续优化温度和 pH 条件时采用的尼古丁浓度为 1 g/L。

为明确菌株 D4 在 18 h 时的尼古丁降解率, 5 个尼古丁浓度下分别进行了测定。18 h 时的尼古丁降解率分别为 89.97% (1 g/L)>33.20% (2 g/L)>11.55% (3 g/L)>4.34% (4 g/L)>3.44% (5 g/L), 1 g/L 浓度下尼古丁降解率显著高于其他浓度下的降解率(图 3B)。

2.2.2 菌株 D4 在不同温度条件下培养 18 h 时的尼古丁降解率

为明确菌株 D4 在 1 g/L 尼古丁培养基中的最适降解温度, 分别设置 26.5、30.0、33.5、37.0、40.5 °C 这 5 个温度, 测定培养 18 h 时的尼古丁降解率(图 3C)。在 26.5–37.0 °C 范围内, 菌株 D4 的尼古丁降解率均达到 90% 以上, 表明菌株 D4 生长温度范围较广, 在 30.0 °C 时尼古丁的降解率最高, 为 96.50%; 但菌株 D4 不耐高温, 在 40.5 °C 条件下, 18 h 时的尼古丁降解率仅为 4.72%, 显著低于其他培养温度。因此菌株 D4 降解尼古丁的最适温度为 30.0 °C。

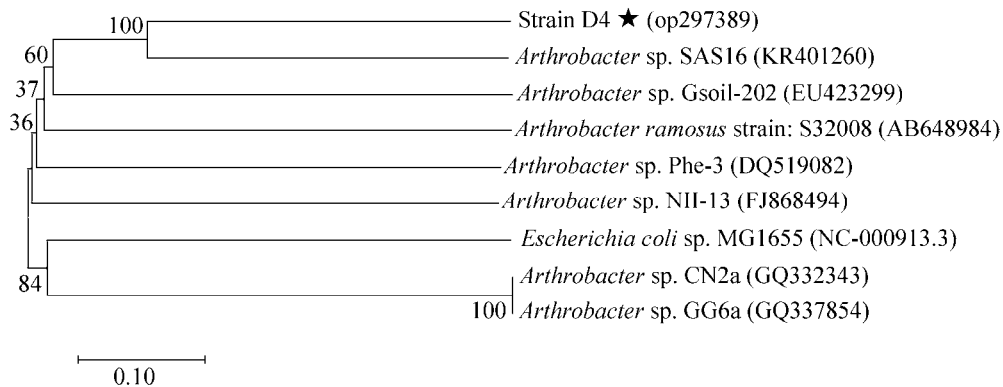


图 2 菌株 D4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 系统发育树分析中选取的菌株为与此菌株 16S rRNA 基因序列一致性在 99% 以上的同属菌株, 并添加大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655 作为 outgroup。图中数字表示自展值, 可用来检验所计算的进化树分支可信度。数值越大, 可信度越大

Figure 2 Phylogenetic tree of strain D4 based on 16S rRNA gene sequence. The strains selected for the phylogenetic tree analysis were strains of the same genus with more than 99% sequence identity to this strain of 16S rRNA gene sequence, and an *E. coli* MG1655 strain was added as an outgroup. The numbers in the figure indicate the spreading values, which can be used to check the confidence of the calculated branches of the evolutionary tree. The higher the value, the greater the confidence.

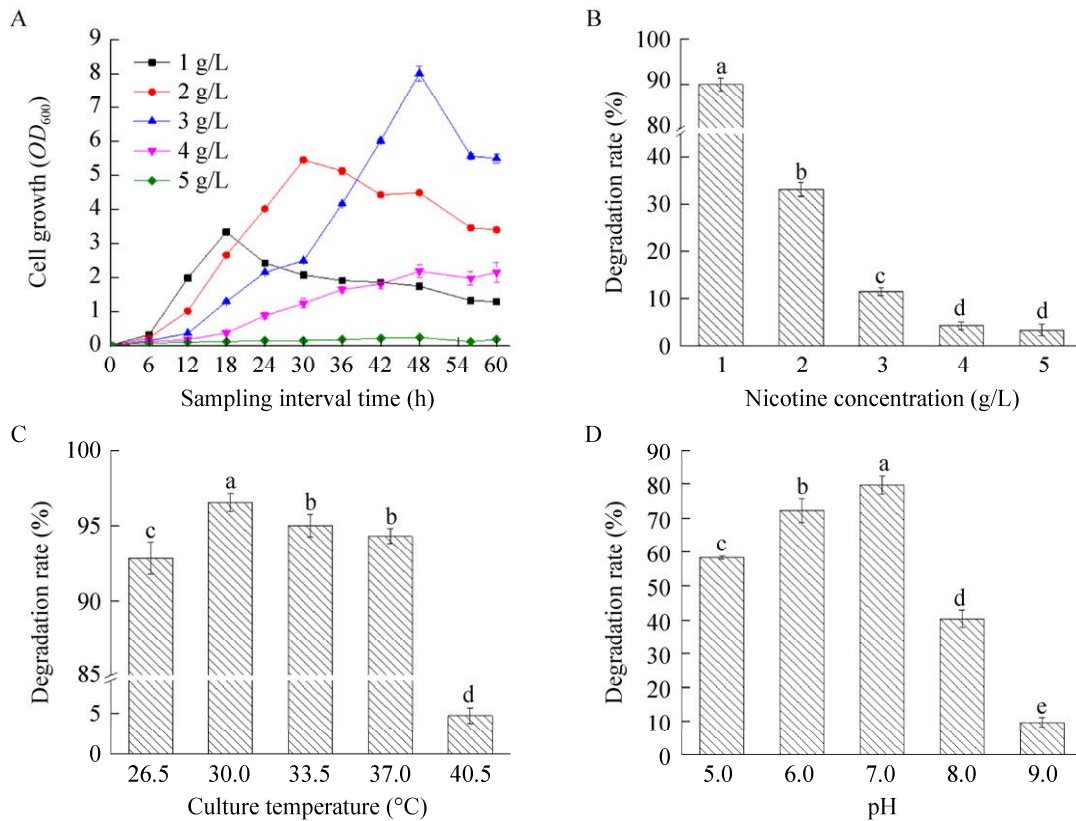


图3 不同实验条件下菌株 D4 的尼古丁降解能力 A: 不同尼古丁浓度条件下菌株的生长曲线; B: 不同尼古丁浓度条件下培养 18 h 时菌株的尼古丁降解率; C: 不同温度条件下培养 18 h 时菌株的尼古丁降解率; D: 不同 pH 条件下培养 18 h 时菌株的尼古丁降解率。平均值多重比较采用 One-way ANOVA Duncan 法, 不同小写字母表示处理间差异有统计学意义($P < 0.05$)

Figure 3 Nicotine degradation capacity of strain D4 under different experimental conditions. A: Growth curve of strain D4 under different nicotine concentrations; B: Nicotine degradation rate of strain D4 at 18 h incubation under different nicotine concentrations; C: Nicotine degradation rate of strain D4 cultured at different temperatures for 18 h; D: Nicotine degradation rate of strain D4 cultured at different pH for 18 h. Data represent means \pm SD ($n=3$) and multiple comparison was performed using One-way ANOVA Duncan method. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

2.2.3 菌株 D4 在不同 pH 条件下培养 18 h 时的尼古丁降解率

为明确菌株 D4 在 1 g/L 尼古丁培养基中的最适降解 pH, 分别设置 5.0、6.0、7.0 (自然 pH)、8.0、9.0 这 5 个 pH 梯度, 测定培养 18 h 时的尼古丁降解率(图 3D)。结果表明, 尼古丁降解率分别为 79.49% (pH 7.0) $>$ 72.14% (pH 6.0) $>$ 58.28% (pH 5.0) $>$ 40.46% (pH 8.0) $>$ 9.68% (pH 9.0)。菌株 D4 在中性或弱酸性条件下对尼古丁的降解效率

较好, 在 pH 7.0 条件下降解效率最高。因此, 菌株 D4 降解尼古丁的最适 pH 为 7.0。

通过上述对发酵条件的优化, 菌株 D4 的最适发酵条件确定为: 尼古丁浓度 1 g/L, 培养温度 30.0 °C, 培养基 pH 为 7.0。

2.3 菌株 D4 的发酵中间代谢产物分析

研究发现, 在菌株 D4 摇瓶发酵过程中, 随着发酵时间的增加, 培养基的颜色会发生显著变化, 从无色(阶段 1)到蓝色(阶段 2), 再到墨绿色

(阶段 3), 最后到浅黄色(阶段 4) (图 4A), 表明菌株 D4 在降解尼古丁过程中有明显的代谢产物变化。分别取 4 个阶段的培养基样品, 采用 GC-MS 测定物质组成和变化。

4 个阶段的样品经过 GC-MS 检测后, 总离子流色谱图显示有四处峰面积发生变化(图 4B 中黑色箭头)。经 NIST08 谱库比对, 四处峰面积代表的物质分别为 N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidone)、尼古丁(nicotine)、麦斯明(myosmine)和可替宁(cotinine) (图 5)。在阶段 1 时, 培养基中只加入了尼古丁, 但有少量的麦

斯明和可替宁被检测出, 表明培养基中外源加入的尼古丁不纯, 含有少量上述物质; 阶段 1 未检出 N-甲基吡咯烷酮。在阶段 2 时, 参照阶段 1 的峰面积, 尼古丁含量减少约 59.58%, 麦斯明和可替宁的含量分别增加 395.32% 和 38.74%; 同时, 该阶段有新物质 N-甲基吡咯烷酮的生成。在阶段 3 时, 参照阶段 1 的峰面积, 尼古丁降解率约 99.62%, 几乎全部被降解; N-甲基吡咯烷酮和可替宁的含量在阶段 2 的基础上继续增加, 相较于阶段 2 分别增加约 52.02% 和 30.08%; 而麦斯明的含量迅速减少, 相较于阶段 2 含量减少

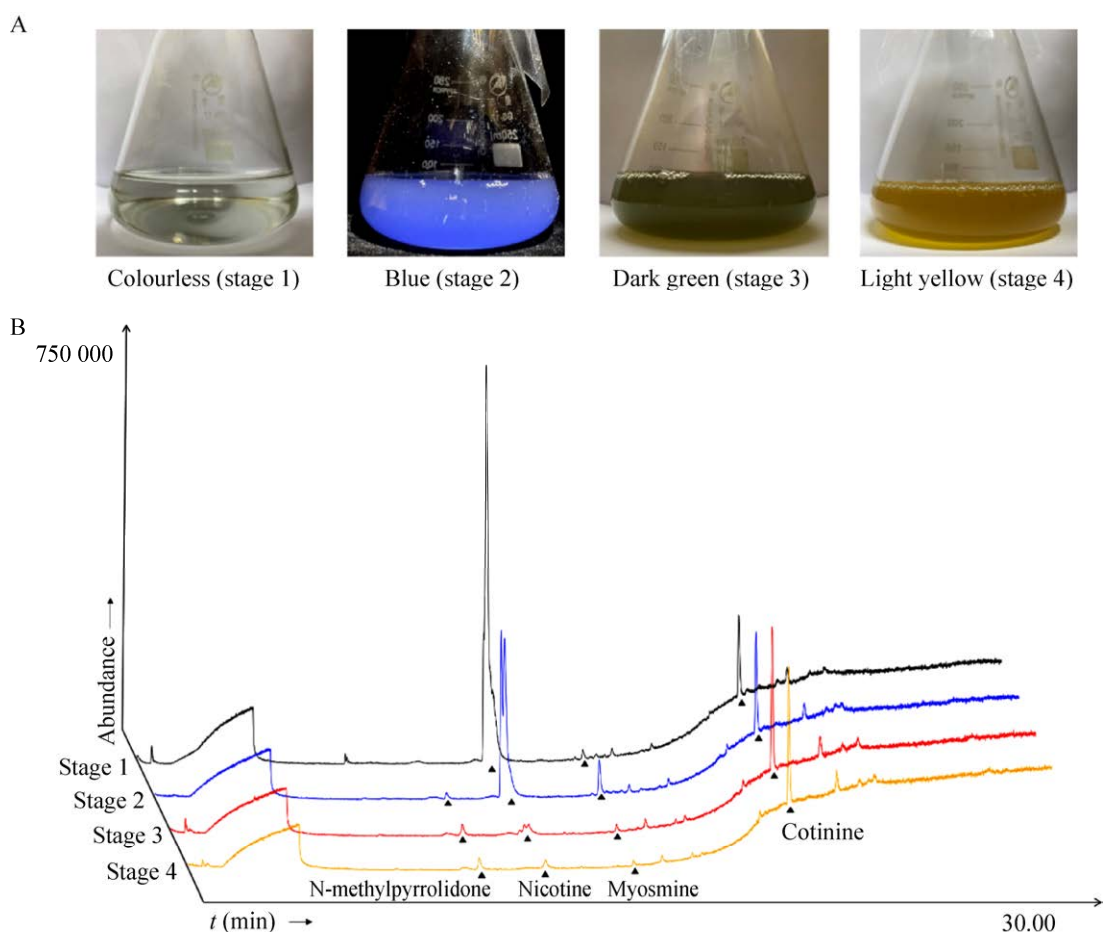


图 4 不同阶段样品颜色和经 GC-MS 检测后的总离子流色谱图 A: 菌株 D4 在不同发酵阶段时尼古丁培养基的颜色; B: 4 个阶段样品经 GC-MS 检测后的总离子流色谱图

Figure 4 Color of samples at different stages and total ion flow chromatogram after detection by GC-MS. A: Color change of nicotine medium during the fermentation of strain D4; B: Total ion flow chromatogram of the 4 phases of samples detected by GC-MS.

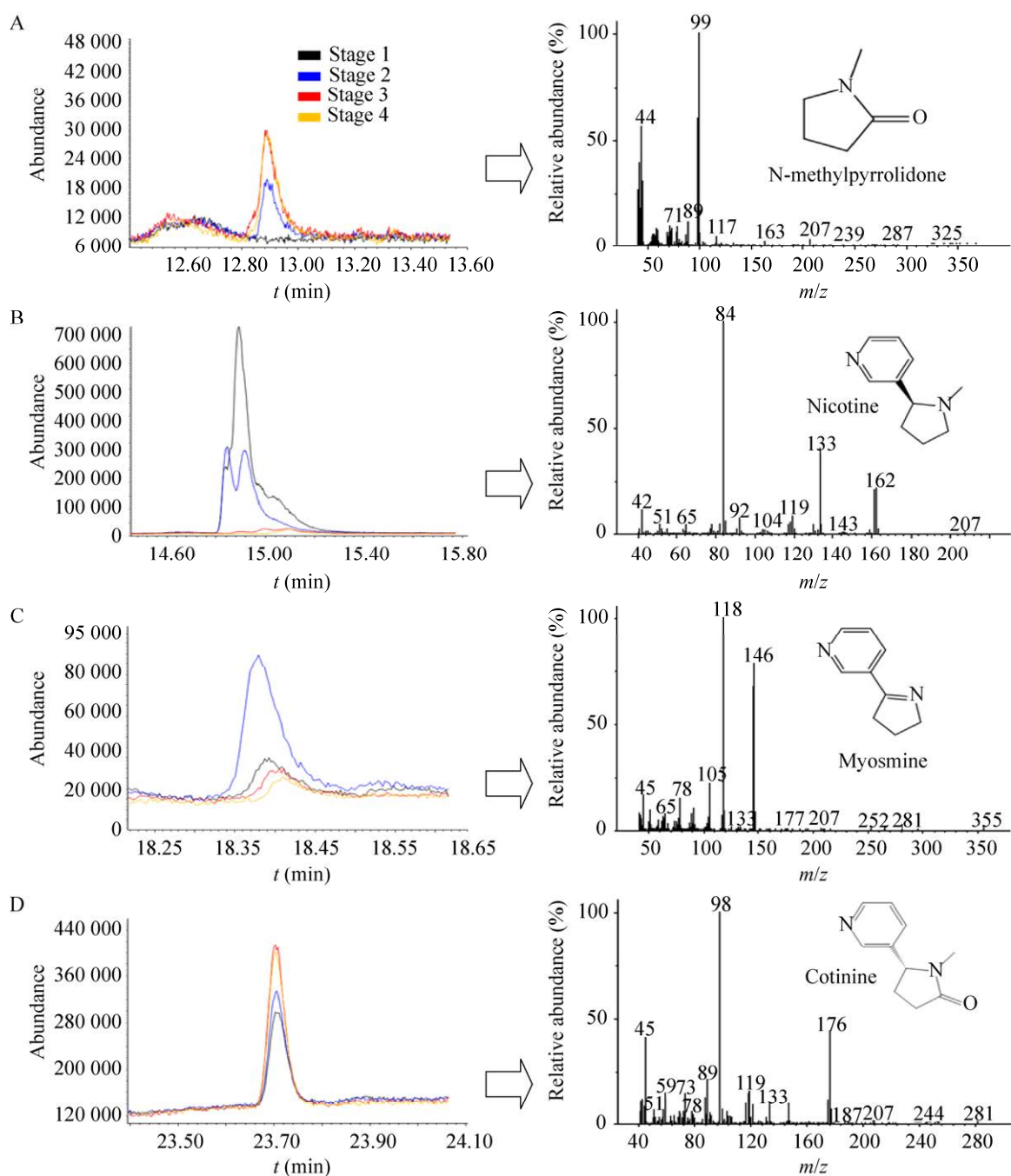


图 5 检测到的物质在不同阶段中的丰度变化比较及其相应质谱图 A: N-甲基吡咯烷酮在不同阶段中的丰度变化比较及其质谱图; B: 尼古丁不同阶段中的丰度变化比较及其质谱图; C: 麦斯明在不同阶段中的丰度变化比较及其质谱图; D: 可替宁在不同阶段中丰度变化比较及其质谱图

Figure 5 Comparison of the changes in abundance of the detected substances in the different phases and their corresponding mass spectra. A: Comparison of the abundance of N-methylpyrrolidone in different phases and its mass spectra; B: Comparison of the abundance of nicotine in different phases and its mass spectra; C: Comparison of the abundance of myosmine in different phases and its mass spectra; D: Comparison of the abundance of cotinine in different phases and its mass spectra.

约 80.96%。在阶段 4 时, N-甲基吡咯烷酮和可替宁的含量与阶段 3 的含量几乎相同, 麦斯明的含量则少于阶段 3 时的含量。上述 4 个阶段的总离子流色谱图的综合分析显示, 随着尼古丁的降解, N-甲基吡咯烷酮和可替宁两种物质的含量呈现持续增加至稳定的趋势, 表明这两种物质很可能是菌株 D4 降解尼古丁途径的终产物; 而麦斯明含量呈现先增加后减少的趋势, 表明该物质可能是代谢途径的一种中间产物。截至目前, N-甲基吡咯烷酮、麦斯明和可替宁在节杆菌属降解途径研究中尚无报道, 因此推测 D4 可能存在新的降解尼古丁的途径, 但本实验 GC-MS 检测未检测出蓝色、墨绿色和淡黄色的物质。

3 讨论

本实验利用常规微生物分离、筛选和鉴定方法, 从植烟土壤中分离出一株以尼古丁为唯一碳源和氮源的节杆菌属菌株 D4, 经鉴定该菌株属于节杆菌属(*Arthrobacter*)。目前国内外报道的降解尼古丁的微生物中, 节杆菌属仍是尼古丁降解方面研究的热门^[3,26-30]。菌株 D4 发酵最适的温度和 pH 值分别为 30.0 °C 和 7.0, 与多数节杆菌属最适条件一致^[3,27]。

作为微生物降解尼古丁领域的热门细菌, 多数节杆菌内存在的途径为吡啶降解途径^[31](图 6A), 而菌株 D4 所检测到的主要代谢产物(N-甲基吡咯烷酮、麦斯明和可替宁)均不存在于该典型的途径中。依据麦斯明的产生及含量变化趋势, 推测菌株 D4 可能含有与真菌 *Aspergillus oryzae* 118222 相似的脱甲基化代谢途径^[32], 即尼古丁的吡咯环脱去甲基形成去甲尼古丁, 然后吡咯环上形成双键生成麦斯明; 麦斯明发生水解形成 N-甲基烟酰胺^[32](图 6B)。降解过程中发现, 可替宁含量逐渐增加至稳定, 推测其可能是菌株 D4 尼古丁降解过程的终产物。根据可替宁含量

的增加趋势, 推测菌株 D4 可能含有与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) CS3 相似的降解尼古丁吡咯烷代谢途径, 即尼古丁经过羟基化生成 1-甲基-5-(3-吡啶基)吡咯烷-2-醇, 进一步转化为可替宁^[23](图 6C)。

降解过程中还检测到可能作为终产物的 N-甲基吡咯烷酮。就目前微生物降解尼古丁研究而言, 尚无产物 N-甲基吡咯烷酮的报道, 因此, 该物质具体的产生途径还有待后续深入研究。根据 N-甲基吡咯烷酮的结构信息, 推测有 2 种可能的产生过程, 一是尼古丁中吡啶环和吡咯环链接的碳碳单键受到攻击, 生成某一种不稳定的中间产物, 导致两环断裂及吡咯环上引入碳氧双键; 二是其可能是部分可替宁的降解产物, 即有少量的可替宁在某种特定条件下转化生成了 N-甲基吡咯烷酮。由于可替宁的产生量要远高于其自身转化生成 N-甲基吡咯烷酮的产量, 才导致两者的含量均有相对增加。阶段 3 到阶段 4 之间, 由于可替宁转化生成 N-甲基吡咯烷酮的特定条件改变, 使此反应不再进行, 两物质含量趋于稳定。菌株 D4 尼古丁降解途径的后续探索, 有助于加深对节杆菌属降解尼古丁代谢途径多样性的了解。

本研究发现, 发酵过程中, 培养基的颜色发生了显著变化(图 4A), 但通过 GC-MS 鉴定出的 4 种代谢产物却均为无色。众多研究已知, 节杆菌属降解尼古丁过程中, 培养基常常变蓝, 其原因主要是代谢产物 2,3,6-三羟基吡啶在有氧条件下自发氧化和羟基化吡啶二聚体生成蓝色聚合物尼古丁蓝(nicotine blue)^[12,15,33,34](图 6A), 该物质多由 LC-MS 检测^[29]。菌株 D4 的培养基变蓝推测也可能是有尼古丁蓝的形成, 若要进一步确定蓝色物质是否为尼古丁蓝, 则需 LC-MS 的检测证据。节杆菌属尼古丁降解途径中尚无培养基变为墨绿色和浅黄色的报道。研究发现, 存在吡

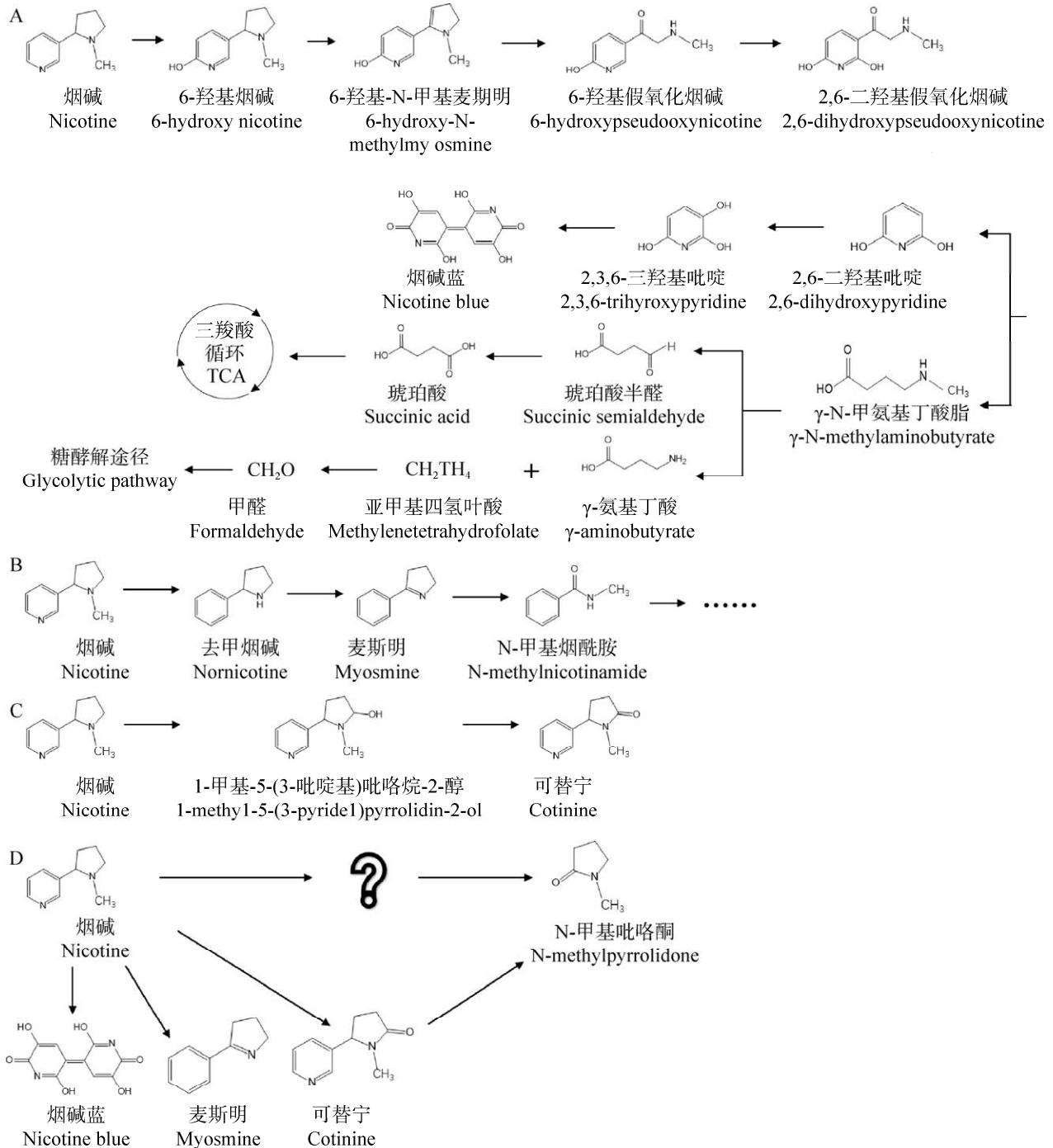


图6 微生物中常见的尼古丁代谢途径 A: 嗜尼古丁节杆菌(*Arthrobacter nicotinovorans*)降解尼古丁的吡啶途径^[31]; B: *Aspergillus oryzae* 118222 降解尼古丁的脱甲基化途径^[32]; C: *Pseudomonas* sp. CS3 降解尼古丁的吡咯烷途径^[23]; D: 菌株 D4 尼古丁降解可能的途径

Figure 6 Common metabolic pathways of nicotine in microorganisms. A: The pyridine pathway of nicotine degradation followed by *Arthrobacter nicotinovorans*^[31]; B: Demethylation pathway of nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 118222^[32]; C: Pyrrolidine pathway of nicotine degradation by *Pseudomonas* sp. CS3^[23]; D: Possible pathways for the degradation of nicotine by strain D4.

咯代谢途径的降解菌(如假单胞菌属)在降解高浓度尼古丁时会产生的绿色产物, 又称“尼古丁绿”^[35], 但该物质的具体结构还未明确。D4 菌株降解中培养基变为墨绿色的原因与之是否有关联还需更多数据。后续的工作将继续聚焦上述有色物质的分离鉴定, 以解析尼古丁代谢过程中培养基颜色变化的机理。

4 结论

本研究从植烟土壤中分离鉴定了一株能降解尼古丁的节杆菌属(*Arthrobacter*)菌株 D4。菌株 D4 降解尼古丁的最适条件为: 1 g/L 的尼古丁浓度, 温度 30.0 °C, pH 7.0。该菌株具有较强的温度适应性, 在弱酸性和中性条件下比碱性条件下降解尼古丁的能力强; 4 g/L 的尼古丁浓度会显著抑制菌株的生长。菌株 D4 降解尼古丁过程中产生了 N-甲基吡咯烷酮、麦斯明和可替宁, 有别于典型的吡啶代谢途径, 推测该菌株可能存在新的尼古丁降解途径。

REFERENCES

- [1] He CJ, Huang YG, Liu P, Wei JH, Yang YR, Xu L, Xiao M. Transcriptome analysis of genes and metabolic pathways associated with nicotine degradation in *Aspergillus oryzae* 112822[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 86
- [2] 陈利平, 宁维, 李瑜, 韩亚伟. 烟草特有亚硝胺的研究进展[J]. 河南农业科学, 2012, 41(12): 7-11
Chen LP, Ning W, Li Y, Han YW. Research development of the tobacco-specific N-nitrosamines[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2012, 41(12): 7-11 (in Chinese)
- [3] Ruan AD, Gao Y, Fang C, Xu YF. Isolation and characterization of a novel nicotinophilic bacterium, *Arthrobacter* sp. aRF-1 and its metabolic pathway[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2018, 65(6): 848-856
- [4] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, De Bertoldi M. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms[J]. Waste Management & Research, 1997, 15(4): 349-358
- [5] Novotny TE, Zhao F. Consumption and production waste: another externality of tobacco use[J]. Tobacco Control, 1999, 8(1): 75-80
- [6] Yu MF, Xia ZZ, Yao JC, Feng Z, Li DH, Liu T, Cheng GJ, He DL, Li XH. Functional analysis of the ocnE gene involved in nicotine-degradation pathways in *Ochrobactrum intermedium* SCUEC4 and its enzymatic properties[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2021, 67(2): 138-146
- [7] Campain JA. Nicotine: potentially a multifunctional carcinogen? [J]. Toxicological Sciences, 2004, 79(1): 1-3
- [8] 邵惠芳, 焦桂珍, 刘金霞, 于建军. 烟碱含量的影响因素及其调控技术[J]. 中国农学通报, 2007, 23(8): 84-88
Shao HF, Jiao GZ, Liu JX, Yu JJ. Influential factors and regulation on nicotine content[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(8): 84-88 (in Chinese)
- [9] 王广山, 陈卫华, 薛超群, 胡晨曦. 烟碱形成的相关因素分析及降低烟碱技术措施[J]. 烟草科技, 2001, 34(2): 38-42
Wang GS, Chen WH, Xue CQ, Hu CX. Analysis of factors related to the formation of nicotine and technical measures to reduce nicotine[J]. Tobacco Science & Technology, 2001, 34(2): 38-42 (in Chinese)
- [10] 关辉, 周艳宾, 朱宏强, 林跃平, 崔英. 采收成熟度对烤烟中上部烟叶品质的影响[J]. 南方农业, 2021, 15(24): 1-3, 7
Guan H, Zhou YB, Zhu HQ, Lin YP, Cui Y. Effects of harvest maturity on the quality of mid-upper flue-cured tobacco leaves[J]. South China Agriculture, 2021, 15(24): 1-3, 7 (in Chinese)
- [11] De Franco MAE, Da Silva WL, Bagnara M, Lansarin MA, Dos Santos JHZ. Photocatalytic degradation of nicotine in an aqueous solution using unconventional supported catalysts and commercial ZnO/TiO₂ under ultraviolet radiation[J]. Science of the Total Environment, 2014, 494/495: 97-103
- [12] Mu Y, Chen Q, Parales RE, Lu ZM, Hong Q, He J, Qiu JG, Jiang JD. Bacterial catabolism of nicotine: catabolic strains, pathways and modules[J]. Environmental Research, 2020, 183: 109258
- [13] Wang MZ, Yang GQ, Min H, Lyu ZM, Jia XY. Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. HF-1 in a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: degradation study and analysis of its mechanisms[J]. Water Research, 2009, 43(17): 4187-4196
- [14] Wang JH, He HZ, Wang MZ, Wang S, Zhang J, Wei W, Xu HX, Lyu ZM, Shen DS. Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter* sp. TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 445-453
- [15] Brandsch R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,

- 2006, 69(5): 493-498
- [16] Pan DD, Sun MM, Wang YW, Lv P, Wu XW, Li QX, Cao HQ, Hua RM. Characterization of nicotine catabolism through a novel pyrrolidine pathway in *Pseudomonas* sp. S-1[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(28): 7393-7401
- [17] Meng XJ, Lu LL, Gu GF, Xiao M. A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(7): 626-633
- [18] Wang SN, Huang HY, Xie KB, Xu P. 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
- [19] Yu H, Tang HZ, Zhu XY, Li YY, Xu P. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. strain SJY1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 272-281
- [20] Ma Y, Wei Y, Qiu JG, Wen RT, Hong J, Liu WP. Isolation, transposon mutagenesis, and characterization of the novel nicotine-degrading strain *Shinella* sp. HZN₇[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(6): 2625-2636
- [21] Gurusamy R, Natarajan S. Current status on biochemistry and molecular biology of microbial degradation of nicotine[J]. The Scientific World Journal, 2013, 2013: 125385
- [22] Liu JL, Ma GH, Chen T, Hou Y, Yang SH, Zhang KQ, Yang JK. Nicotine-degrading microorganisms and their potential applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(9): 3775-3785
- [23] Wang HH, Yin B, Peng XX, Wang JY, Xie ZH, Gao J, Tang XK. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS₃ and its metabolites[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(2): 258-268
- [24] 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
- [25] Breed RS, Murray EGD, Smith NR. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Hensyl WR, Eds.; Williams and Wilkins: Baltimore, Maryland, 1994
- [26] 邓娜娜, 罗笛, 钟娟, 周金燕, 谭红. 高烟碱耐受力降解菌 *Arthrobacter* sp. AH14 的鉴定及其降解条件的优化[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(5): 62-71
- Deng NN, Luo D, Zhong J, Zhou JY, Tan H. Identification and degradation optimization of a high nicotine endurance strain *Arthrobacter* sp. AH14[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(5): 62-71 (in Chinese)
- [27] 帖金鑫, 张相辉, 余翔, 余梦灵, 马林. 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
- Tie JX, Zhang XH, Yu X, Yu ML, Ma L. Condition optimization of *Arthrobacter* Z3 degrading burley nicotine by response surface methodology[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2014, 43(12): 160-164 (in Chinese)
- [28] 申永防, 张广乐, 王静, 张可可, 刘畅, 王中杰, 朱大恒. 根癌农杆菌与嗜烟碱节杆菌降解烟碱特性的对比分析[J]. 烟草科技, 2013, 46(11): 82-85
- Shen YF, Zhang GL, Wang J, Zhang KK, Liu C, Wang ZJ, Zhu DH. Comparison of nicotine degrading behavior between *Agrobacterium tumefaciens* and *Arthrobacter nicotinovorans*[J]. Tobacco Science & Technology, 2013, 46(11): 82-85 (in Chinese)
- [29] 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: 中国农业大学博士学位论文, 2005
- Ma L. Characterization of a nicotine dehydrogenase from the *Arthrobacter nicotinovorans* and its application in tobacco process[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2005 (in Chinese)
- [30] 黄晓春, 雷丽萍, 夏振远, 吴玉萍, 杨开健. 节杆菌降解烟碱增香作用机理的初步研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(6): 1867-1869
- Huang XC, Lei LP, Xia ZY, Wu YP, Yang KJ. Preliminary study on mechanism of degradation of nicotine and increasing of scent of *Arthrobacter* sp.[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(6): 1867-1869 (in Chinese)
- [31] Fitzpatrick PF. The enzymes of microbial nicotine metabolism[J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2018, 14: 2295-2307
- [32] Uchida S, Maeda S, Kisaki T. Conversion of nicotine into normicotine and N-methylmyosmine by fungi[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1983, 47(9): 1949-1953
- [33] Knackmuss HJ, Beckmann W. The structure of nicotine blue from *Arthrobacter oxidans*[J]. Archiv Für Mikrobiologie, 1973, 90(2): 167-169
- [34] 王晓萍, 石贤爱, 王毓虹, 魏增, 陈倩, 陈东海. 尼古丁降解微生物的研究进展及潜在价值[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2017, 33(3): 109-116
- Wang XP, Shi XN, Wang YH, Wei Z, Chen Q, Chen DH. Research progresses and potential values of nicotine-degrading microorganisms[J]. Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition, 2017, 33(3): 109-116 (in Chinese)
- [35] Wada E, Yamasaki K. Mechanism of microbial degradation of nicotine[J]. Science, 1953, 117(3033): 152-153