

一株高效烟碱降解菌的筛选及其在烟草烘烤中的应用

郭青青¹, 许天驰¹, 杨春雷², 孙光伟², 杨久红², 余君², 杨勇^{1*}

(1.湖北大学生命科学学院,湖北武汉 430062;2.湖北省烟草科学研究院,湖北武汉 430030)

摘要 在湖北恩施的连作土壤中分离出一种能够高效降解烟碱的细菌 P3a,从形态结构特征、16S rDNA 序列分析以及建构系统发育树等方面对其进行鉴定,结果表明 P3a 为节杆菌(*Arthrobacter* sp.)。该菌株能在 pH 7.0、温度 37 °C、230 r/min 的条件下,36 h 内对 2 g/L 烟碱的降解率为 99.06%。并将菌株 P3a 应用到新鲜的烟叶中,发现它可以减少 1 kg 新鲜烟叶中 55.11% 的烟碱。鉴于其对烟碱的降解能力很强,可高效地应用于环境和烟草废弃物中烟碱降解。

关键词 烟碱降解菌;筛选;鉴定;高效液相色谱法;烟草烘烤;应用

中图分类号 TS41⁴ 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)16-0045-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.16.013



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening of a Highly Effective Nicotine-degrading Bacterium and Its Application in Tobacco Baking

GUO Qing-qing¹, XU Tian-chi¹, YANG Chun-lei² et al (1. College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan, Hubei 430062; 2. Hubei Provincial Tobacco Research Institute, Wuhan, Hubei 430030)

Abstract Bacteria P3a was isolated from continuous cropping soil in Enshi of Hubei Province, and identified from morphological and structural characteristics, 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree construction. The results showed that P3a was *Arthrobacter* sp.. At pH 7.0, temperature 37 °C and 230 r/min, the degradation rate of 2 g/L nicotine was 99.06% within 36 hours. When the strain P3a was applied to fresh tobacco leaves, it was found that it could reduce nicotine by 55.11% in one kilogram of fresh tobacco leaves. In view of its strong ability of nicotine degradation, it could be effectively applied to nicotine degradation in the environment and tobacco waste.

Key words Nicotine-degrading bacteria; Screening; Identification; High performance liquid chromatography; Tobacco baking; Application

烟碱又名尼古丁,分子式 $C_{10}H_{14}N_2$, 是烟草中的主要生物碱,是烟草和卷烟质量评价的重要因素。烟碱是吸烟成瘾的关键成分,且对人体也有一定程度的损伤。如高淑芳等^[1]研究表明,烟碱可以轻易穿过血脑屏障和生物膜对人体造成影响,尤其是当妇女处在妊娠期时,会导致新生儿易患病,神经和智力发育也会受阻。同时,随着烟草制品的大量生产和消费,包括烟碱、氨基联苯、萘胺、苯并(a)芘等有毒物质在内的烟草废弃物进入了环境,这些有害物质无法回收利用,已经产生严重的环境问题^[2-3]。当烟碱含量超过 0.05% (W/W) 时,这些废物被欧盟规定为有毒有害物质^[4]。如果处理不当,这些废物可能损害人类健康和环境。数据显示,生产 1 t 卷烟需要排放 60 t 以上烟草废水^[5],且我国烟草制品中普遍存在烟碱含量过高的问题,因此对于环境和烟草制品中的烟碱降解是非常有必要的。

目前对于烟碱的降解主要集中在生物处理方面,与物理、化学处理方法相比,微生物降解菌在成本、效率和可持续性方面都具有优势^[6]。在生物降解烟碱的方法中,主要报道的烟碱降解菌多属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、苍白杆菌属(*Paleobacillus*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)^[7-8]。Wang 等^[9]从烟草根际土壤中分离出一种高效降解的菌株 *Agrobacterium* sp. strain S33,它能在最优的培养条件下将 1 g/L 烟碱在 6 h 内完全降解;张娟^[10]从湖南省的烟草土壤中筛得菌株 *Pseudomonas marginalis*. ND,可在 2 d 内将 1 g/L 液体培养基中的烟碱降解 70.40%。截至目前,有关烟

碱降解菌的研究工作尚处于筛选过程,较少地应用到烟草制品及废弃物的降解上。该研究从湖北恩施多年连作的烟田中分离得到一株能够高效降解烟碱的菌株,并对菌株的降解能力进行测定,优化其培养环境,并尝试应用于烟草烘烤过程中,其研究成果不仅可以丰富降解菌株资源,并为降解菌应用于烟草实际生产中提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤来源。筛选高效烟碱降解菌的土壤样本来自湖北恩施的烟草种植区。

1.1.2 培养基。LB 培养基:每 1 000 mL 蒸馏水加 NaCl 10 g、酵母粉 5 g、蛋白胨 10 g, pH 为 7.0,于 115 °C 灭菌 20 min。基础盐培养基(MSM):每 1 000 mL 蒸馏水加 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g、 $MgSO_4$ 0.2 g、 $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.01 g、 $FeSO_4$ 0.001 g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.5 g、 KH_2PO_4 1.5 g, pH 为 7.0,于 115 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 试剂。烟碱标准品(HPLC>99%),购自安徽酷尔生物工程有限公司;甲醇色谱级(质量分数 \geq 99%),购自阿拉丁公司;其他试剂均为 AR 级试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 降解菌的筛选。将收集的土壤分别取 10 g,放于 90 mL 灭菌去离子水中,180 r/min 振荡过夜获得菌悬液。吸取 10 mL 的菌悬液接种到烟碱浓度为 1 g/L 的 LB 液体培养基中,温度 37 °C,230 r/min 培养 3 d 后再吸取菌悬液 100 μ L 进行第二次驯化,如此循环 3 次,参考文献[11]进行驯化。从终浓度的培养基中吸取菌悬液 100 μ L 接种到烟碱浓度为 1 g/L 的基础盐培养基中,温度 37 °C,230 r/min 培养 2 d 后,随后吸取菌悬液 100 μ L 接种到烟碱浓度为 2 g/L 的基础盐培养基中,温度 37 °C,230 r/min 培养 2 d,依次传代接种至烟

作者简介 郭青青(1997—),女,陕西咸阳人,硕士研究生,研究方向:烟草品质调制。*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事烟草病害防治及品质研究。

收稿日期 2022-03-29

碱浓度为 5 g/L 的基础盐培养基,取最后一次的菌悬液 100 μ L 涂布 LB 固体培养基中,反复纯化多次分离,挑选形态鲜明、菌落清晰的不同单菌落。将不同形态特征的单菌落采用甘油保存方式,保存于 -80 $^{\circ}$ C 的超低温冰箱中,备后续试验所用。

1.2.2 菌种鉴定。形态结构观察及生理生化试验参照文献《常见细菌系统鉴定手册》进行。

分子生物学鉴定:通过 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)得到目标菌株的基因组,进行 PCR 扩增。反应体系:DNA 模板 5 μ L,正反向引物各 1 μ L,dNTP (10 mmol/L) 1 μ L,10 \times Extaq buffer 5 μ L,Extaq 1 μ L,加 ddH₂O 补足体系至 50 μ L。引物序列:27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'),1492R (5'-GGTTACCTGT-TACGACTT-3');扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变形 3 min;94 $^{\circ}$ C 变形 1 min,61 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存 30 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的大小为 1 450 bp 左右,并与 GenBank 中的 16S rRNA 序列进行比对。

1.2.3 培养条件对菌株降解能力的影响。在 LB 固体培养基平板上进行降解菌株的活化,并转移到 LB 液体培养基中作为种子液,检测单因子条件下降解菌株降解能力。①温度的影响。将降解菌种子液以 2% 的接种量接种到以烟碱为唯一碳源的 MSM 培养基中,烟碱的浓度为 2 g/L,pH 为 7.0,不同温度(28、37、45 $^{\circ}$ C),230 r/min 培养 36 h,每 12 h 取样一次,利用 HPLC 检测其降解情况。②初始 pH 的影响。将降解菌种子液以 2% 的接种量接种到以烟碱为唯一碳源的 MSM 培养基中,烟碱的浓度为 2 g/L,不同 pH(5.5、6.0、6.5、7.0、8.0)下,温度 37 $^{\circ}$ C,230 r/min 培养 36 h,每 12 h 取样一次,利用 HPLC 检测其降解情况。③接种量的影响。将降解菌种子液以不同接种量(1%、2%、3%、4%)接种到以烟碱为唯一碳源的 MSM 培养基中,烟碱的浓度为 2 g/L,pH 为 7.0,温度 37 $^{\circ}$ C,230 r/min 培养 36 h,每 12 h 取样一次,利用 HPLC 检测其降解情况,降解率=(CK 组峰面积-降解菌组峰面积)/CK 组峰面积 \times 100%。

1.2.4 培养条件对菌株生长的影响。探究影响菌株生长的碳源(葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、乳糖、可溶性淀粉和麦芽糖)、氮源(蛋白胨、酵母浸粉、酵母膏、牛肉膏和玉米浆干粉)和无机氮源(醋酸铵、氯化铵、硫酸铵、硝酸铵和硝酸钠)对降解菌株的生长影响;将降解菌种子液以 2% 的接种量接种到以烟碱为唯一碳源的 MSM 培养基中,烟碱的初始浓度为 2 g/L,pH 为 7.0,温度 37 $^{\circ}$ C,230 r/min 培养 12 h,每 2 h 取样一次,用紫外分光光度计测定 600 nm 处的 OD 值,共 6 次。在 MSM 培养基中分别加入 1、2、3、4、5、6 g/L 烟碱,菌株 P3a 接种量为 2%,每 12 h 采集一次,共 5 次,同样用紫外可见分光光度计测定 600 nm 处的 OD 值。

1.2.5 烟叶烘烤过程中降解菌的降解能力。在烟叶固化前,利用降解菌株降低烟碱含量。利用优化后的培养基培养菌株 24 h,将发酵液离心浓缩蒸馏至浓度为 5×10^9 CFU/mL。

最后,对每 1 kg 新鲜烟叶喷洒 100 mL 的细菌溶液,而对照组的蒸馏水量相同。采用 GB/T 23225—2008 分光光度法测定烟叶烟气固化后的烟碱含量。

1.2.6 菌株生物量的测定。用紫外分光光度计测定 600 nm 处 OD 值,则为菌株的生物量。有效检测范围为 0~0.8,如果数值超过该范围,则需要对样品稀释。

1.2.7 菌株降解率的检测。所有样品的烟碱浓度均采用 C₁₈(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)柱检测(HPLC)。流动相为甲醇:1 mmol/L 硫酸=25:75;流速 0.6 mL/min;注入量 20 μ L;波长 259 nm;温度 30 $^{\circ}$ C。发酵液每 6 h 取样一次,12 000 r/min 离心 10 min。然后在 4 $^{\circ}$ C 处沉积取上清液。发酵过程完成后,用 0.05 mol/L 盐酸稀释 20 倍,最后用 0.22 μ m 的滤膜过滤,用 HPLC 测定。

1.2.8 烟碱脱氢酶活性的检测。将降解菌接种于 LB 液体培养基中,优化发酵培养。摇瓶发酵 12 h 后收集细菌,细菌缓冲悬液超声破裂,用紫外分光光度计测定 576 nm 处 OD 值。

1.3 数据分析 采用 SPSS 19.0 软件和 Excel 进行数据的描述统计分析。

2 结果与分析

2.1 烟碱降解菌的富集、分离和鉴定 分离出 1 株以烟碱为碳源和氮源的菌株,命名为 P3a。采用高效液相色谱法(HPLC)检测了 P3a 和原有降解菌 EA-17^[12]对初始浓度为 2 g/L 烟碱的降解情况。结果表明(表 1),P3a 在 24 h 对烟碱的降解率为 70.03%,36 h 为 99.06%;EA-17 在 24 h 对烟碱的降解率为 54.14%,36 h 为 97.87%,P3a 的降解能力较高于 EA-17。

菌株 P3a 在 LB 固体培养基上的形态:菌落呈圆形,柠檬黄不透明,表面光滑,无晕环,无凸起(图 1a)。通过 PCR 的 16S rRNA 序列测定,并经 Blast 程序比对,发现菌株 P3a 与节杆菌 *Arthrobacter* sp.AD7(JF775581.1)的相似度为 99%,表明菌株 P3a 为节杆菌属,故命名为节杆菌 P3a(*Arthrobacter* sp. P3a),并且在构建的系统发育树中,菌株 P3a 也与 *Arthrobacter* sp.处于同一分支(图 1b)。同时,菌株 P3a 的 16S rDNA 的测序结果已上传到 GenBank 数据库,注册登录号为 MK342527.1。

表 1 不同菌株对烟碱降解峰的统计学结果

Table 1 Statistical results of nicotine degradation peaks of different strains

处理 Treatment	出峰时间 Peak time min	峰面积 Peak area	降解率 Degradation rate/%
CK	3.986	3 027.7	5.11
P3a(24 h)	3.993	907.5	70.03
P3a(36 h)	3.896	28.4	99.06
EA-17(24 h)	3.993	1 388.4	54.14
EA-17(36 h)	3.896	64.5	97.87

2.2 培养条件对菌株 *Arthrobacter* sp.P3a 生长和降解能力的影响

2.2.1 烟碱标准曲线和 *Arthrobacter* sp.P3a 的生物量。通过

紫外分光光度计测定 OD_{600} 获得了菌株 P3a 生长状态, P3a 的指数期为 6~10 h, 16 h 后生物量没有明显变化, 菌株 P3a 的最大生物量出现在 12 h 时, 此时降解速率最为明显(图 2)。

在烟碱的初始浓度为 2 g/L, 加入菌株 P3a 种子液的降

解发酵液随着发酵过程的变化而出现颜色变化, 发酵溶液的颜色在 12 h 时为蓝色, 36 h 为深蓝色, 48 h 接近黑色, 后转为褐色, 最后是浅褐色; 推测是在发酵过程中产生了几种代谢物(图 3)。

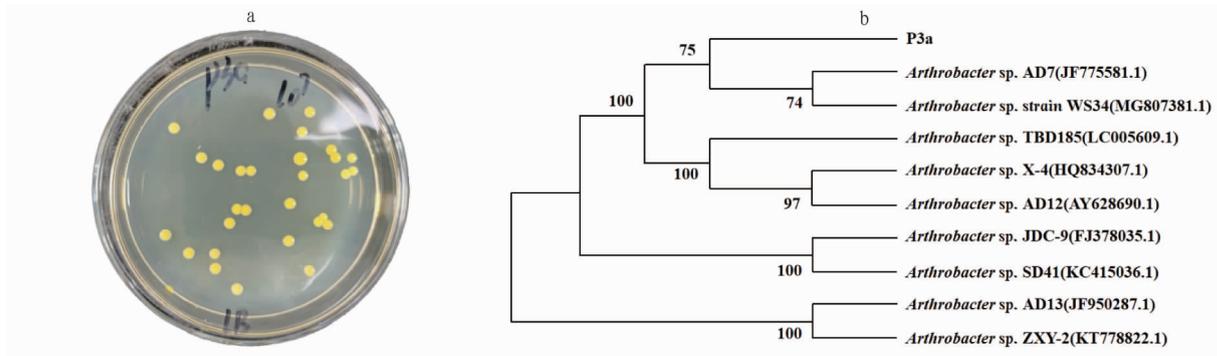


图 1 *Arthrobacter* sp. P3a 的平板菌落 (a) 和系统发育树 (b)

Fig.1 Plate colony (a) and phylogenetic tree (b) of *Arthrobacter* sp. P3a

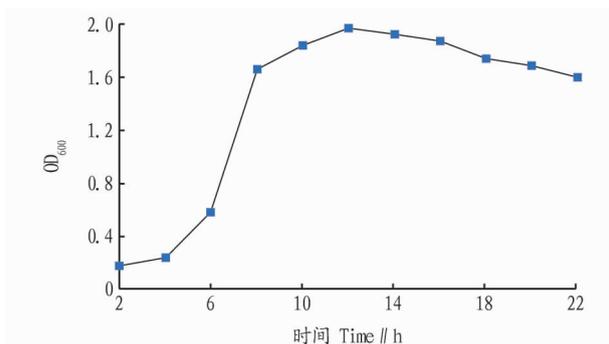


图 2 降解菌株 P3a 22 h 内的生物量变化

Fig.2 Biomass changes of degraded strain P3a in 22 hours

2.2.2 不同条件下 *Arthrobacter* sp. P3a 的烟碱降解率。通过 HPLC 检测得到, 在烟碱的浓度为 2 g/L、pH 为 7.0、温度 37 °C、230 r/min 的条件下, 菌株 P3a 在 12 h 的降解率达到 36.45%, 24 h 的降解率达到 70.03%, 36 h 的降解率高达 99.06% (图 4)。通过 HPLC 检测得到, 当 pH 为 7.0 时, 烟碱的降解效果最好, 在 pH 为 5.5 和 8.0 时, 烟碱的降解率较低, 因此, 菌株 P3a 对烟碱降解的适应性 pH 为 6.5~7.0 (图 5a)。图 5b 显示, 菌株 P3a 在 45 °C 时不能生长, 在 28 和 37 °C 降解 36 h 时, 降解率基本相同, 但在 12~24 h 28 °C 比 37 °C 条件下降解率高。因此, P3a 降解烟碱的最佳温度为 28 °C。图 5c 显示, 当接种量为 1% 时, 其接种速度明显慢于其他 3 种接种

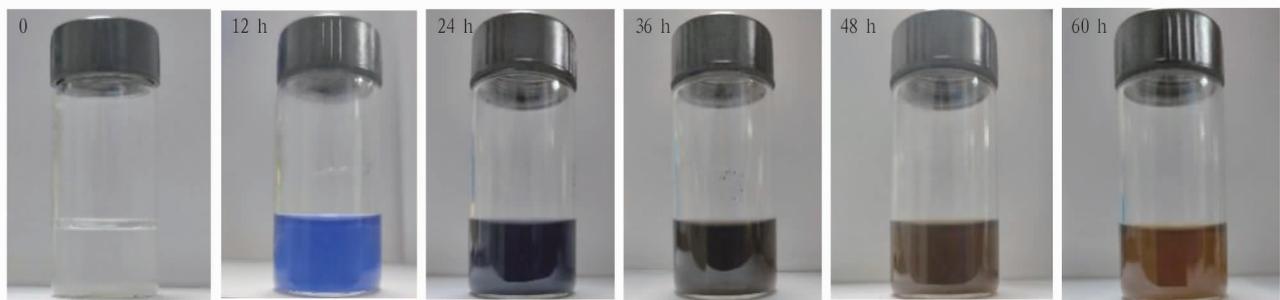


图 3 烟碱降解发酵液的颜色变化情况

Fig.3 Color change of the fermentation liquid of the nicotinic acid

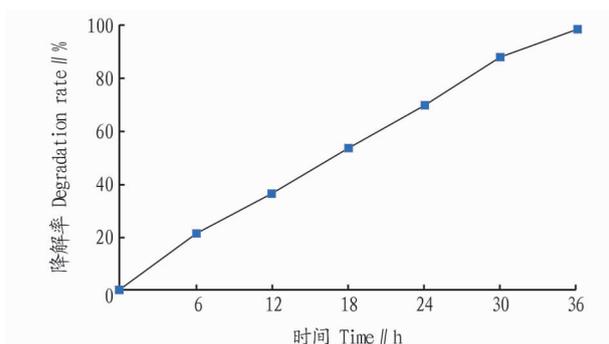


图 4 36 h 菌株 P3a 的降解率情况

Fig.4 Degradation rate of strain P3a at 36 h

量; 其余 3 种接种量的降解率相似, 其中 4% 略高于 3% 和 2%。因此, 当接种量为 2% 时, 就足以降解 2 g/L 的烟碱。

2.2.3 不同培养条件下 *Arthrobacter* sp. P3a 的生物量。以葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、乳糖、可溶性淀粉和麦芽糖作为碳源 (1%), 与无碳源的空白对照 (CK) 相比, 所有碳源都能促进菌株 P3a 的生长; 当以葡萄糖为碳源时, 该菌株的生长条件最好, 因此选择其作为发酵培养的碳源 (图 6a)。进一步的试验分析表明, 8.5 g/L 葡萄糖是最佳含量。以蛋白胨、酵母浸粉、酵母膏、牛肉膏和玉米浆干粉作为有机氮源 (0.5%), 当添加玉米浆干粉时, P3a 的生物量最大, 因此在发酵培养中采用玉米浆干粉作为有机氮源 (图 6b)。进一步分析表明,

采用 2.5% 玉米浆干粉可达到有机氮的最佳浓度。在发酵培养基中分别加入醋酸铵、氯化铵、硫酸铵、硝酸铵和硝酸钠作为无机氮源 (0.05 mol/L), 与 CK 组相比, 无机氮源对菌株 P3a 的生长没有显著影响; 在这几种无机氮源中, 硝酸铵的添加使得菌株 P3a 的生物量相对最大, 因此, 选择硝酸铵作为无机氮源 (图 6c)。

由图 6d 可知, 低浓度的烟碱 (1~2 g/L) 菌株 P3a 的长势很好, 在烟碱浓度较高的情况下, 长势较为缓慢, 在 5 g/L 烟碱作用下仍能良好生长, 6 g/L 烟碱会抑制 P3a 的生长。由此可见, 菌株 P3a 对烟碱的耐受性很高, 能承受较高浓度烟碱的环境, 在烟碱降解的实际应用中能很好发挥生物性能。

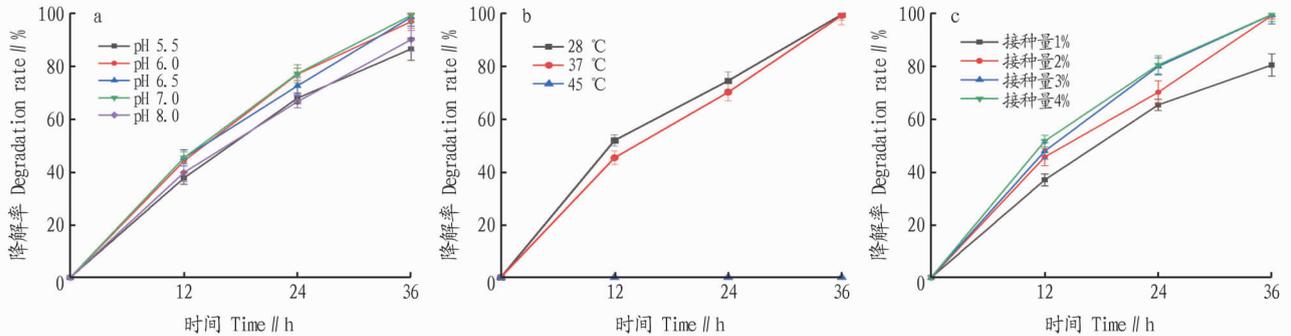
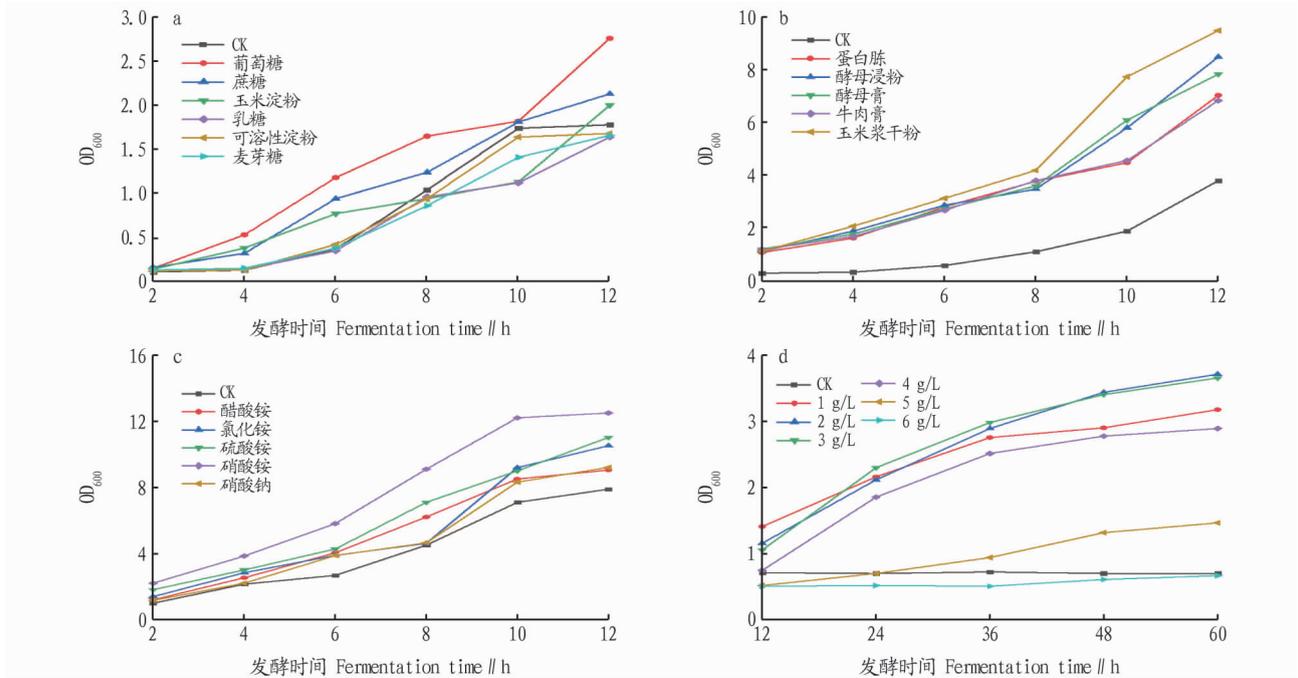


图 5 pH (a)、温度 (b) 和接种量 (c) 对菌株 P3a 烟碱降解的影响

Fig.5 Effects of pH (a), temperature (b) and inoculum size (c) on nicotine degradation of strain P3a



注: a. 不同碳源; b. 不同有机氮源; c. 不同无机氮源; d. 不同浓度烟碱

Note: a. Different carbon sources; b. Different organic nitrogen sources; c. Different inorganic nitrogen sources; d. Different concentrations of nicotine

图 6 不同培养条件下菌株 P3a 生物量变化

Fig.6 Biomass changes of strain P3a under different culture conditions

2.3 菌株 P3a、EA-17 中尼古丁脱氢酶活性的测定 将 P3a 和 EA-17 分别接种于基础盐培养基、LB 培养基和最优培养基中发酵培养, 结果表明 (图 7), LB 培养基中尼古丁脱氢酶的平均活性为 3.12 ± 0.41 , 最优培养基的平均活性为 9.01 ± 0.63 , 其中菌株 P3a 的尼古丁脱氢酶活性高于菌株 EA-17。

2.4 降解菌株 *Arthrobacter* sp. P3a 在烟草生产中的应用 采用 GB/T 23225—2008 分光光度法测定烟叶烟气固化后的烟碱含量, 结果表明 (表 2), 菌株 P3a 对烟碱的降解率

明显高于空白对照, 降解率达到 55.11%。

3 讨论与结论

从烟田土壤中分离到 1 株能够利用烟碱作为唯一碳源和氮源的菌株 *Arthrobacter* sp. P3a, 经菌种鉴定为节杆菌属。近年来, 烟碱降解菌的报道很多, 有些菌属的降解途径已比较明确, 特别是节杆菌属。节杆菌属的降解途径是吡啶途径, 即先从吡啶环的羟基化开始, 经一系列的酶促反应最终生成 2,3,6-三羟基吡啶进入三羧酸 (TCA) 循环, 同时产生蓝

色素,该途径的第一步是烟碱在尼古丁脱氢酶的催化下开始的。在整个途径中产生了几种酶,如尼古丁脱氢酶、6-羟基-1-尼古丁氧化酶和酮脱氢酶^[13-16]。因此,也不难理解培养液的颜色变化,以及 P3a 的尼古丁脱氢酶的活性高于 EA-17,高达 9.01。

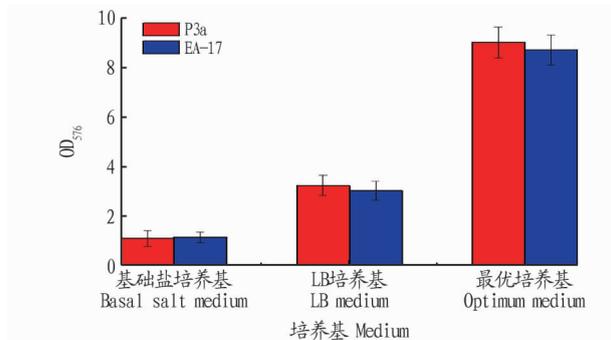


图7 不同培养基下菌株 P3a 和 EA-17 的尼古丁脱氢酶活性

Fig.7 Nicotine dehydrogenase activities of strains P3a and EA-17 in different media

表2 菌株 P3a 对烟叶烘烤过程中烟碱降解的影响

Table 2 Effects of strain P3a on nicotine degradation during tobacco baking %

处理 (Treatment)	烟碱含量 (Nicotine content)	降解率 (Degradation rate)
喷施 P3a (Spray P3a)	0.79	55.11
CK (清水) (CK (clean water))	1.76	5.88

Arthrobacter sp.P3a 能在 37 °C、pH 7.0 的条件下,将初始浓度为 2 g/L 烟碱作为唯一碳源和氮源,在培养 36 h 内可降解 99.06% 的烟碱。且探究了该菌株的最优培养条件,即在以葡萄糖作为碳源,以玉米浆干粉为有机碳源,以硫酸铵为无机氮源时,菌株 P3a 最佳 pH 为 6.5~7.0,与假单胞菌属 HF-1 和节杆菌 aRF-1 相似^[17-18];最适生长温度为 28 °C,与米曲霉 112822^[19-20] 相似。P3a 能在烟碱浓度为 5 g/L 的情况下良好生长,相比苍白杆菌 SJY1 (3.0 g/L) 和假单胞菌 HF-1 (2.0 g/L) 的烟碱耐受性^[17,21],P3a 有很强的耐受性。并将它应用到新鲜的烟叶中,发现它可以减少 1 kg 新鲜烟叶中 55.11% 的烟碱;鉴于其对烟碱的降解能力很强,可高效地应用于环境和烟草废弃物中的烟碱降解。

参考文献

[1] 高淑芳,于皓,王姝,等.孕期尼古丁暴露对新生儿神经、智力及生长发育的影响[J].浙江实用医学,2018,23(5):324-326.

(上接第 44 页)

[9] 许文志,欧阳平,罗付香,等.中国畜禽粪污处理利用现状及对策探讨[J].中国农学通报,2017,33(23):106-112.

[10] 陶秀萍.畜禽养殖废弃物处理和利用技术模式[J].中国禽业导刊,

- [2] WANG S N, XU P, TANG H Z, et al. "Green" route to 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine from (S)-nicotine of tobacco waste by whole cells of a *Pseudomonas* sp. [J]. Environmental science & technology, 2005, 39(17): 6877-6880.
- [3] GURUSAMY R, NATARAJAN S. Current status on biochemistry and molecular biology of microbial degradation of nicotine [J]. The scientific world journal, 2013, 2013: 1-15.
- [4] NOVOTNY T E, ZHAO F. Consumption and production waste: Another externality of tobacco use [J]. Tobacco control, 1999, 8(1): 75-80.
- [5] MAZAR N, ZHONG C B. Do green products make us better people? [J]. Psychological science, 2010, 21(4): 494-498.
- [6] DE FRANCO M A E, DA SILVA W L, BAGNARA M, et al. 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.
- [7] PASSANANTI M, TEMUSSI F, IESCE M R, et al. Photoenhanced transformation of nicotine in aquatic environments: Involvement of naturally occurring radical sources [J]. Water research, 2014, 55(2): 106-114.
- [8] WANG S N, HUANG H Y, XIE K B, 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.
- [9] WANG S N, 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.
- [10] 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, 2012.
- [11] 曾思钰, 凌雪萍, 张长杰, 等. 花生四烯酸产生菌高山被孢霉的高糖驯化研究 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 645-653.
- [12] 王瑞, 施河丽, 陈守文. 烟碱降解菌的分离、鉴定及其在烟草秸秆发酵中的应用研究 [C] // 中国烟草学会 2015 年度优秀论文集汇编. 北京: 中国烟草学会, 2015: 1212-1224.
- [13] 陈辰. 一株新的高效尼古丁降解菌的分离鉴定、降解条件优化及代谢机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [14] 申永防, 张广东, 王静, 等. 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.
- [15] YANG G F, WEI Z, SUN W J, et al. Purification and enzymatic characterization of membrane-bound d-gluconate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis* [J]. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 2015, 113: 14-22.
- [16] REZNICEK O, FACEY S J, HAUER B. Draft genome sequence of a papaverine-degrading, Gram-positive *Arthrobacter* sp., isolated from soil near Hohenheim, Germany [J]. Genome announcements, 2015, 3(3): 1.
- [17] 邵铁娟. 假单胞菌菌株 HF-1 的尼古丁代谢途径及其分子生物学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [18] RUAN A D, GAO Y, FANG C, et al. Isolation and characterization of a novel nicotophilic bacterium, *Arthrobacter* sp. aRF-1 and its metabolic pathway [J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2018, 65(6): 848-856.
- [19] 黄有贵. 米曲霉尼古丁去甲基酶的分离纯化及尼古丁诱导的转录组分析 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [20] MENG X J, LU L L, GU G F, et al. A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves [J]. Research in microbiology, 2010, 161(7): 626-633.
- [21] YU H, TANG H Z, ZHU X Y, 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.

2016, 33(2): 36-37.

[11] 刘双, 刘文科, 刘燕. 家禽业废弃物处理与资源化利用模式 [J]. 北方牧业, 2017(12): 14-15.

[12] 杨琴, 樊战辉, 孙家宾, 等. 大城市近郊畜禽粪例资源化利用问题及对策: 以成都市新津县为例 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(35): 87-90.