فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۶۹- ۸۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹

جداسازی و غربال‌گری باکتری بومی *سیتروباکتر* با تحمل‌پذیری بالا به نیکوتین و معرفی آن به عنوان بیوکاتالیست برای پاک‌سازی زیستی نیکوتین

مراحم آشنگرف *: استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir

چکیده

مقدمه: نیکوتین از آلکالوئیدهای گیاهی سمی است که سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا آن را از سال ۱۹۹۴در زمره مواد خطرناک برای سلامت انسان و محیط زیست قرار داده است. پژوهش حاضر، در زمینه غربال‌گری باکتری‌های مقاوم به نیکوتین برای استفاده به عنوان بیوکاتالیست در پاک‌سازی نیکوتین از مکان‌های آلوده انجام شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از ۱۲ مزرعه زیر کشت توتون به عنوان محل‌های هدف برای نمونه‌گیری انتخاب شد. غنی‌سازی جدایه‌های باکتری تجزیه کننده نیکوتین در محیط‌های پایه نمکی حاوی نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت انجام شد. آزمون الگوی تحمل‌پذیری ذاتی جدایه‌ها به نیکوتین با استفاده از روش رقت در آگار انجام شد. تعیین هویت سویه منتخب بر اساس آزمون‌های فنوتیپیک و فیلوژنیک انجام شد. به منظور تعیین شرایط مطلوب حذف نیکوتین در سویه منتخب، اثر غلظت نخستین نیکوتین، زمان گرماگذاری و اثر منابع کربن و ازت کمکی بررسی شد. اندازه‌گیری میزان نیکوتین باقی مانده با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) انجام شد.

نتایج: از مجموع ۲۰ سویه جداشده تجزیه کننده نیکوتین، سویه باکتری TPS2 بالاترین مقاومت و حذف نیکوتین را نشان داد. نتایج آزمون‌های فنوتیپیک و فیلوژنیک نشان داد که سویه یاد شده به جنس *سیتروباکتر* (با کد شناسایی KM110046 در بانک ژن) تعلق دارد. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش‌های نیکوتین‌زدایی در سویه TPS2، پس از گذشت ۶۰ ساعت کمابیش ۱۰۰ درصد نیکوتین حذف شد. البته در شرایطی که ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین همراه با ۲/۵ گرم در لیتر قند فروکتوز استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که باکتری *سیتروباکتر* غربال‌گری شده گزینه مناسبی برای پاک‌سازی زیستی نیکوتین از پساب صنایع و مکان‌های آلوده است. انتظار می‌رود که با استفاده از این بیوکاتالیست میکروبی بتوان مشکلات زیست محیطی ناشی از نیکوتین سمی را کاهش داد. مطالعه اخیر نخستین گزارش از معرفی یک میکروارگانیسم بومی تجزیه کننده نیکوتین است.

واژه‌های کلیدی: الگوی تحمل‌پذیری ذاتی، باکتری *سیتروباکتر*، بیوکاتالیست، پاک‌سازی نیکوتین

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

نیکوتین با فرمول بسته C10H14N2، آلکالوئید اصلی گیاه توتون [1] بوده، به‌طوری که ۳ تا ۵ درصد وزن خشک (وزنی/ وزنی) برگ‌های توتون را تشکیل می‌دهد. این ماده به عنوان تحریک کننده و در عین حال مهار کننده گیرنده‌های گانگلیوزیدی عمل کرده و ایجاد وابستگی و اعتیاد را در مصرف کننده به همراه دارد (۱). در ارتباط با آثار زیان‌بار نیکوتین بر سلامت انسان، پژوهش‌های زیادی انجام شده و امروزه بدون شک نیکوتین در ردیف مواد سمی خطرناک معرفی می‌شود. با ورود نیکوتین به بدن، اختلالات فیزیولوژیک شدید از قبیل اختلالات گوارشی، اختلالات بینایی و شنوایی، افت شدید فشار خون، افزایش و نامنظم بودن ضربان‌های قلب، کلاپس قلبی- عروقی، نارسایی تنفسی، تشنج و در نهایت، مرگ را به دنبال خواهد داشت (۲). نیکوتین هم در دود ناشی از مصرف دخانیات و هم در شیره حاصل از انواع جویدنی تنباکو وجود دارد. همچنین، نیکوتین در زباله‌ها و پسماندهای صنایع مختلف از جمله کارخانه‌های تولید دخانیات، سموم دفع آفات و صنایع دارویی وجود دارد و سبب آلودگی محیط زیست به ویژه منابع آب (به خاطر ماهیت هیدروفیلیک نیکوتین) می‌شود (۳ و ۴). سالانه میلیون‌ها تن پسماند حاوی نیکوتین در سرتاسر دنیا تولید می‌شود که در برخی از این پسماندها غلظت نیکوتین ورودی بیش از ۱/۸ درصد (وزنی/ حجمی) تخمین زده شده است (۵). این در حالی است که بر اساس استانداردهای زیست محیطی اتحادیه اروپا، چنانچه غلظت نیکوتین در پساب‌ها و فاضلاب‌های تولیدی از ۰/۰۵ درصد (وزنی/ حجمی) تجاوز کند، این فاضلاب‌ها در زمره مواد بسیار سمی و خطرناک رده‌بندی می‌شوند (۶). با توجه به روند رو به رشد صنایع مرتبط با نیکوتین و به تبع آن مشکلات درمانی و زیست- محیطی ناشی از تجمع ضایعات و پسماندهای نیکوتینی در طبیعت، ضرورت حذف نیکوتین سمی از محیط‌های آلوده کاملا ضروری است. برای تصفیه و پاک‌سازی فاضلاب‌های حاوی نیکوتین روش‌های فیزیکی- شیمیایی و زیستی متعددی وجود دارد که در این میان، استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان کاتالیست‌های زیستی برای پاک‌سازی محیط‌های آلوده به نیکوتین می‌تواند مؤثر و ارزان باشد و ایمنی محیطی را تضمین کند (۶ و ۷). اگرچه نیکوتین در غلظت‌های پایین برای بیشتر میکروارگانیسم‌ها به شدت سمی است، با این حال باکتری‌های مختلفی با پتانسیل تجزیه‌کنندگی نیکوتین از منابع مختلف جداسازی و تعیین هویت شده‌اند. از مهم‌ترین باکتری‌های تجزیه کننده نیکوتین می‌توان گونه‌های مختلف جنس‌های *آسینتوباکتر* [2] (۸)، *آگروباکتریوم* [3] (۹)، *آرتروباکتر* [4] (۱۰ و ۱۱)، *سلولوموناس* [5] (۱۲)، *انسی فر* [6] (۴)، *آگروباکتروم* [7] (۱۳)، *سودوموناس* [8] (۵، ۱۴- ۱۹) و *رودوکوکوس* [9] (۲۰) را نام برد. با توجه به آثار سمی نیکوتین و اینکه ورود آن به اکوسیستم‌های آبی و خاکی می‌تواند زندگی انسان و سایر موجودات را تهدید کند و با توجه به نبود پژوهش متکی بر میکروارگانیسم‌های بومی، ضرورت جداسازی و غربال‌گری میکروارگانیسم‌های با پتانسیل پاک‌سازی نیکوتین مشخص می‌شود. هدف از انجام پژوهش حاضر، در مرحله اول، جداسازی و تعیین ویژگی باکتری‌های با پتانسیل تحمل‌پذیری ذاتی بالا نسبت به نیکوتین، بررسی توانایی این باکتری‌ها در

استفاده از نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و در انتها، تأثیر منابع کربن و ازت کمکی بر فرآیند حذف نیکوتین با هدف بهره‌برداری از این بیوکاتالیست برای پاک‌سازی نیکوتین سمی از محیط‌های آلوده در پروژه‌های آتی است. در این راستا سویه‌های باکتری متعددی از خاک‌های زیر کشت توتون از مناطق مختلف ایران جدا و برای نخستین بار تجزیه زیستی نیکوتین در جنس *سیتروباکتر* [۱۰] گزارش شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبیولوژیک: نیکوتین (۹۹ درصد) برای آزماش‌های نیکوتین‌زدایی از شرکت سیگما [۱۱] خریداری شد. متانول با درجه خلوص بالا و مخصوص HPLC از مرک [۱۲] تهیه شد. محیط کشت نوترینت آگار [۱۳] (۵ گرم در لیتر پپتون، ۳ گرم در لیتر عصاره گوشت و ۲۰ گرم در لیتر آگار و pH برابر با ۷/۴) از شرکت کاردان آزما [۱۴] خریداری شد. نمک‌های KH_2PO_4، K_2HPO_4، NaCl، $MgSO_4$، $FeSO_4$ و $CaCl_2$ برای تهیه محیط‌های پایه نمکی "Nic-medium agar" متشکل از ترکیبات زیر (بر حسب گرم در لیتر) از کمپانی کیولب [۱۵] خریداری شد. مواد به کار گرفته شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از شرکت سیناژن تهیه شد.

KH_2PO_4: ۴; $K_2HPO_4.3H_2O$: ۱۳/۳; $MgSO_4.7H_2O$: ۰/۲; $CaCl_2$: ۰/۰۱۵; NaCl: ۰/۵; $FeSO_4.7H_2O$: ۰/۰۳; Agar: ۲۰

نمونه‌برداری و غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه کننده نیکوتین: با توجه به هدف پژوهش، مناسب‌ترین مکان برای نمونه‌گیری خاک‌های زیر کشت توتون بود. برای این منظور ۱۲ مزرعه توتون در اطراف استان‌های مازندران، گیلان، گلستان، اصفهان و کردستان به عنوان محل‌های هدف برای نمونه‌گیری انتخاب شد. نمونه‌های خاکی در ظروف پلاستیکی درب‌دار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. در ادامه برای غنی‌سازی باکتری‌های بومی تجزیه کننده نیکوتین از یک روش غنی‌سازی طبق روش پیشنهادی لیو [۱۶] و همکاران (۱۹)، با اندکی تغییرات، استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سوسپانسیونی از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در سرم فیزیولوژیک استریل (محلول نمک سدیم کلراید با غلظت ۰/۸۵ وزنی/ حجمی) تهیه شد. پس از تهیه رقت‌های متوالی از $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۵}$ حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون یاد شده به عنوان مایه تلقیح به محیط‌های پایه نمکی (Nic Medium Agar) انتقال یافت. به محیط یاد شده نیکوتین، پس از استریل شدن از طریق فیلترهای سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی، در غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر به عنوان تنها منبع کربن و ازت افزوده شد. سپس، محیط‌های کشت تلقیح شده در شرایط تاریکی و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز گرماگذاری شد. در صورت مشاهده رشد، از تک کلونی‌های رشد یافته برای کشت خطی روی پلیت‌های "Nic-medium agar" تا حصول اطمینان از خالص شدن کلونی‌ها استفاده شد. پس از بررسی‌های ریخت‌شناسی و انجام برخی آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد، کلونی‌های یاد شده به عنوان باکتری‌های واقعی تجزیه کننده نیکوتین در محیط‌های اسلنت دار نوترینت آگار حاوی ۱ گرم در لیتر نیکوتین برای آزماش‌های بعدی انتقال داده شدند.

ارزیابی میزان تحمل‌پذیری ذاتی باکتری‌های تجزیه کننده نیکوتین و انتخاب باکتری کارآمد: با هدف شناسایی و انتخاب سویه‌های باکتری برتر با قابلیت حذف زیستی نیکوتین، در ابتدا آزمون تعیین الگوی تحمل‌پذیری ذاتی جدایه‌ها نسبت به نیکوتین در محیط‌های سنتتیک و کمپلکس با استفاده از روش رقت در آگار[۱۷] انجام شد (۲۱). برای این منظور، ابتدا محیط‌های سنتتیک "Nic-medium agar" و کمپلکس نوترینت آگار با غلظت‌های مختلف نیکوتین تهیه شد (غلظت‌های نیکوتین: ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ گرم در لیتر). ۱۱ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری هر کدام حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت آگار ذوب شده و ۱۱ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر "Nic-medium agar" ذوب شده تهیه و توسط دستگاه اتوکلاو استریل شد. سپس، با استفاده از فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی، حجم مورد نیاز از استوک نیکوتین استریل به ارلن‌ها اضافه شد. محیط‌های موجود در ارلن‌های یاد شده درون پلیت‌های (با قطر ۱۲ سانتی‌متری) جداگانه ریخته شد و هر پلیت با خط کش به ۲۰ قسمت مساوی (به تعداد میکروارگانیسم‌های جدا شده) تقسیم شد. پس از تهیه نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/ml) از سویه‌های باکتری مورد آزمایش، به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی درون پلیت‌های یاد شده تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته گرماگذاری شدند. آزمایش‌های سه بار تکرار شد. در ادامه و پس از شناسایی سویه‌های با قابلیت تحمل‌پذیری بالا، به منظور انتخاب سویه منتخب از روش کروماتوگرافی استفاده شد. برای این هدف، سویه‌های تحمل پذیر در محیط غربال‌گری "nic-medium broth" با غلظت نهایی ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ رشد داده شدند. سپس، تحلیل کیفی HPLC برای انتخاب سویه باکتری کارآمد انجام شد. در تمام مراحل آزمایش، یک نمونه شاهد بدون تلقیح باکتری استفاده شد (۱۹).

تعیین هویت سویه منتخب TPS2 بر اساس آزمون‌های فنوتیپیک و فیلوژنیک: شناسایی مقدماتی سویه TPS2 بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی از جمله رنگ و شکل ظاهری کلونی، رنگ آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز، آزمون حرکت، احیای نیترات، هیدرولیز اوره، آزمون اندول، متیل رد، وژپروسکوئر، مصرف سیترات، رشد در شرایط بی هوازی، تولید H_2S و رشد بر روی محیط کشت مک کانکی آگار انجام شد (۲۲). در ادامه به منظور شناسایی دقیق‌تر سویه باکتری TPS2، از روش توالی‌یابی *16S rRNA* استفاده شد. استخراج DNA ژنومی سویه TPS2 با استفاده از کیت[۱۸] انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با روش‌های اسپکتروفتومتریک و الکتروفورز مشخص شد. به منظور تکثیر بخشی از توالی *16S rRNA* به طول ۳۷۰ جفت باز از یک جفت پرایمرهای همگانی به نام‌های rw01 (پرایمر رفت با توالی AACTGGAGGAAGGTGGGGAT) و dg74 (پرایمر برگشت با توالی AGGAGGTGATCCAACCGC) استفاده شد (۲۳). تکثیر محصول PCR بر اساس اطلاعات جدول‌های ۱ و ۲ انجام گرفت.

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در سویه

مواد	حجم لازم برای واکنش با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر	غلظت اولیه
بافر PCR	5	10 X
مخلوط dNTP	۴	۲/۵ میلی‌مولار
$MgCl_2$	۱/۵	۵۰ میلی‌مولار
پرایمر Forward	۰/۲	۱۲۵ میکرومولار
پرایمر Reverse	۰/۲	۱۲۵ میکرومولار
Taq polymerase	۰/۲	۵ واحد آنزیم در میکرولیتر
DNA الگو	۱	۱ میکروگرم بر میکرولیتر
آب MiliQ	۳۷/۹	-

جدول ۲- چرخه حراتی واکنش PCR انجام شده برای تعیین جنس

ردیف	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
سیکل اول	۹۴	۲	۱
سیکل دوم	۹۴	۰/۵	۳۰
	۶۰	۰/۵	
	۷۲	۰/۴۵	
سیکل سوم	۷۲	۲	۱

محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد، ولتاژ ۹۰ و در شرایط بافری TBE بررسی شد. محصول حاصل از PCR (در حدود ۳۷۰ جفت باز) برای توالی‌یابی به کمپانی ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. برای تعیین همولوژی، توالی حاصل با توالی‌های موجود در بانک NCBI از طریق الگوریتم BLASTN [۱۹] مقایسه شد. به منظور ثبت توالی نهایی به دست آمده در بانک ژنی GeneBank از نرم افزار sequin 13.05 [۲۰] استفاده شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنیک و ترسیم درخت به کمک نرم افزارهای BioEdit و MEGA.6 [۲۱] و بر پایه روش neighbor-joining و با Bootstrap ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (۲۴).

ارزیابی میزان حذف زیستی نیکوتین توسط سویه بومی TPS2 و اثر برخی عوامل بر روی آن: در این مرحله، میزان کمی حذف زیستی نیکوتین در سویه باکتری TPS2 که بر اساس تحلیل‌های پروفایل تحمل‌پذیری و تحلیل کیفی HPLC به عنوان سویه برتر انتخاب شد، سنجش شد. برای این کار محیط‌های کشت "Nic-medium broth" تهیه و با اتوکلاو استریل و سپس، نیکوتین استریل در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱/۵، ۲/۵ و ۴ گرم در لیتر) استفاده شد. از سویه برتر، ۰/۵ مک فارلند تهیه و ۳ درصد از آن به محیط‌های یاد شده تلقیح شد. سویه یاد شده در یک دوره ۴۸ ساعته در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. درصد حذف نیکوتین با استفاده از دستگاه HPLC تعیین شد. در دستگاه HPLC [۲۲] از ستون C18 (اندازه قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون)، به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. فاز متحرک به کار گرفته شده مخلوطی از متانول/ اسید سولفوریک یک میلی‌مولار (به نسبت ۵ به ۹۵ حجمی/ حجمی) بود که به شکل ایزوکراتیک با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه روی ستون فرستاده شد. طول موج استفاده شده ۲۶۰ نانومتر و حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. تمام مراحل آزمایش در دمای اتاق انجام گرفت (۱۹). در شرایط کروماتوگرافی یاد شده، زمان بازداری [۲۳] برای نیکوتین در زمان ۶/۶ دقیقه به دست آمد. در ادامه و پس از تعیین غلظت بهینه نیکوتین و بررسی اثر منابع کربن مختلف (گلوکز، فروکتوز، سوکروز، گلیسرول و سیترات سدیم) و منابع ازت مختلف (عصاره مخمر، تریپتون، اوره و کلرید آمونیوم)،

دوره زمانی درصد حذف نیکوتین توسط سویه بومی TPS2 در محیط‌های نمکی حاوی نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و محیط‌های نمکی نیکوتین دار حاوی منابع کربن و ازت بهینه سنجش شد.

نتایج

نتایج غربال‌گری باکتری‌های مقاوم به نیکوتین و انتخاب سویه باکتری بومی برتر: در آزمایش‌های غربال‌گری نخستین، ۲۰ سویه باکتری بومی تجزیه کننده نیکوتین از خاک‌های زیر کشت توتون از مناطق مختلف ایران بر اساس روش غنی‌سازی جداسازی شد که در بررسی‌های ریخت‌شناسی نخستین مشتمل بر ۱۰ باسیل گرم منفی، ۳ کوکسی گرم مثبت، ۲ باسیل گرم مثبت و ۵ کوکوباسیل گرم منفی بودند. تحمل‌پذیری ذاتی میکروارگانیسم‌های جداسازی شده نسبت به نیکوتین در محیط‌های کشت سنتتیک و کمپلکس بر اساس روش رقت در آگار تعیین شد (جدول ۳).

جدول ۳- الگوی تحمل‌پذیری جدایه‌های باکتری تجزیه کننده نیکوتین در محیط‌های کشت سنتتیک و کمپلکس

جدایه باکتری	میزان تحمل‌پذیری (گرم در لیتر)	محیط کشت نمکی Nic
	محیط کشت نوتینت آگار	
TPS1	۱۱	۷
TPS2	۱۲	۸
TPS3	۱۱	۶
TPS4	۱۲	۶
سایر ۱۶ جدایه باکتری	کمتر از ۱۰	کمتر از ۵

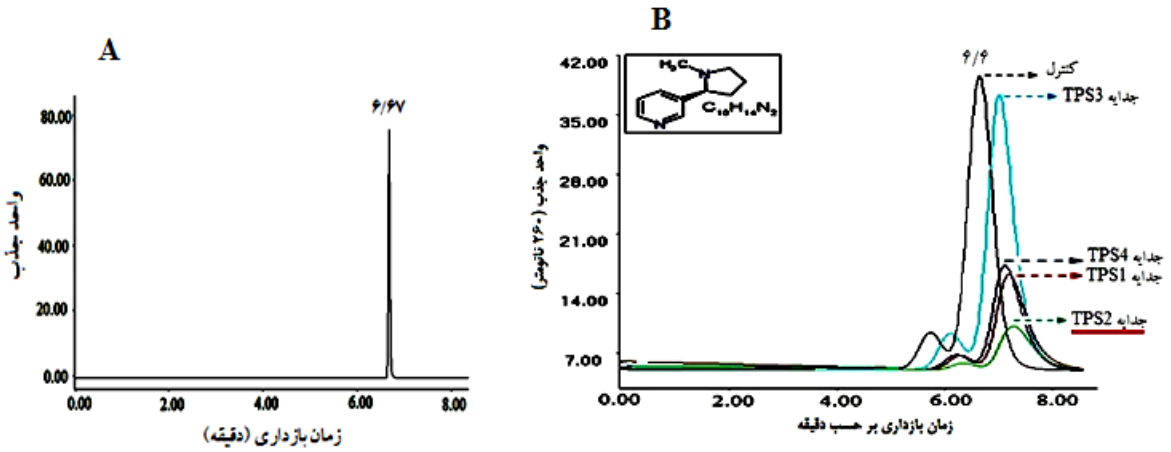
میزان تحمل‌پذیری جدایه‌های باکتری نسبت به نیکوتین در محیط‌های سنتتیک بین ۳ تا ۸ گرم در لیتر و در محیط‌های کمپلکس ۶ تا ۱۲ گرم در لیتر بود. با توجه به نتایج و بررسی جدول ۳ مشخص شد که ۴ سویه باکتری (نام‌گذاری شده با عنوان TPS1-TPS4) بالاترین مقاومت را نسبت به نیکوتین (بالاتر از ۵ گرم در لیتر در محیط‌های سنتتیک و بالاتر از ۱۰ گرم در لیتر در محیط‌های کمپلکس) را نشان دادند که بر این اساس به عنوان سویه‌های برتر برای آزمایش‌های بعدی غربال‌گری برگزیده شدند. در بخش دیگر از این کار پژوهشی، با هدف انتخاب سویه برتر، ارزیابی میزان حذف زیستی نیکوتین در سویه‌های مقاوم با استفاده از تحلیل کیفی HPLC مطالعه شد (شکل ۱). همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است سویه مقاوم TPS2 (جدا شده از خاک زیر کشت توتون مازندران) در مقایسه با ۳ سویه مقاوم دیگر توانایی بالاتری در حذف زیستی نیکوتین از محیط‌های کشت سنتتیک داشت. در کشت‌های کنترل (حاوی ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین و بدون تلقیح باکتری) حذف زیستی نیکوتین مشاهده نشده است که نشان می‌دهد نیکوتین قابلیت حذف شدن در شرایط غیر زیستی را ندارد.

نتایج تعیین هویت سویه بومی TPS2: سویه TPS2 را که بر اساس پروفایل تحمل‌پذیری و تحلیل HPLC قابلیت بالاتری در حذف زیستی نیکوتین از محیط‌های کشت حاوی نیکوتین را داشت را انتخاب و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شناسایی شد. جدول ۴ ویژگی‌های تاکسونومیک سویه باکتری TPS2 را نشان می‌دهد.

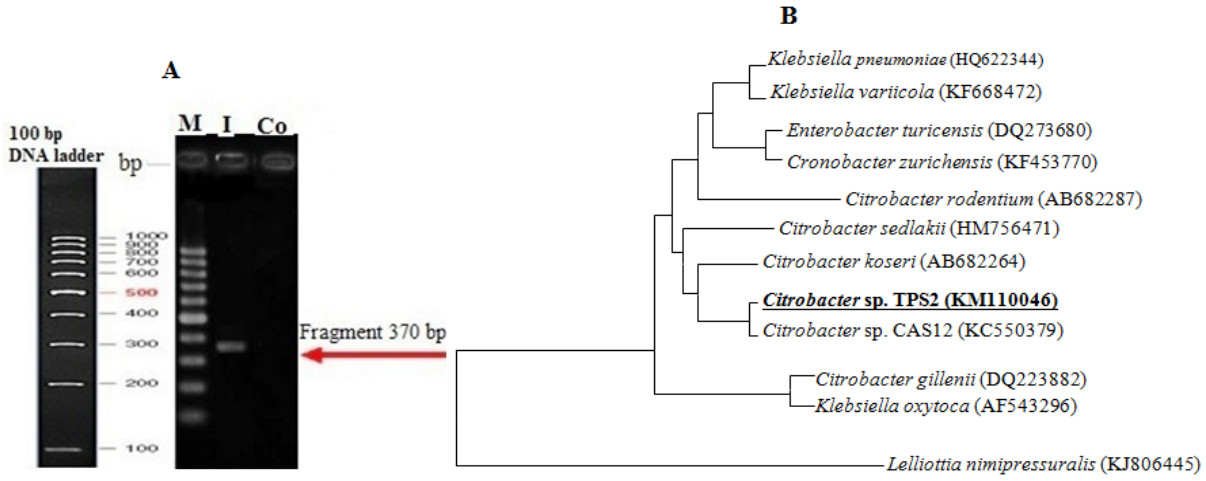
جدول ۴- آزمون‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی سویه باکتری TPS2

آزمون‌های شناسایی	سویه باکتری TPS2
ریخت شناسی	میله‌ای شکل
واکنش گرم	منفی
کاتالاز	مثبت
اکسیداز	منفی
حرکت	مثبت
مصرف سیترات	مثبت
متیل رد	مثبت
وژپروسکوئر	منفی
هیدرولیز اوره	مثبت
اندول	مثبت
تولید H_2S	منفی
رشد روی مک کانکی آگار	مثبت

با توجه به صفات فنوتیپیک مطالعه شده، کتاب‌های مرجع و مقالات منتشره در این زمینه، می‌توان به‌طور موقت سویه TPS2 را در جنس *سیتروباکتر* قرار داد. برای شناسایی دقیق سویه TPS2، ابتدا DNA ژنومی استخراج و سپس، ژن کد کننده *16S rRNA* از طریق پرایمرهای جهانی rw01 و dg74 مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۲ قسمت A). همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود. توالی نوکلئوتیدی *16S rRNA* مورد نظر دارای اندازه‌ای در حدود ۳۷۰ جفت باز است که مربوط به ترادف *16S rRNA* باکتری *اشریشیاکلی* [۲۴] (Position 1100-1450/1500) است. پس از توالی‌یابی محصول PCR، تطابق توالی نوکلئوتیدی 16S rRNA سویه باکتری TPS2 با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که باکتری مورد نظر به جنس *سیتروباکتر* تعلق داشته و دارای درصد تشابه ۹۹ درصدی (با مقدار پوشش E value برابر صفر و query coverage برابر ۱۰۰) با باکتری *سیتروباکتر* سویه CAS12 (با شماره دسترسی KC550379) است. بنابراین، توالی نوکلئوتیدی *16S rRNA* باکتری یاد شده در GeneBank با شماره دسترسی KM110046 ثبت شد. در ادامه نتایج ترسیم درخت فیلوژنیک تایید کرد که سویه TPS2 را می‌توان از نظر تاکسونومی به عنوان سویه‌ای از جنس *سیتروباکتر* طبقه‌بندی کرد (شکل ۲ قسمت B).



شکل ۱- (A) کروماتوگرام نیکوتین استاندارد و (B) کروماتوگرام های HPLC حاصل از تجزیه زیستی نیکوتین در شرایط سلول‌های رویشی ۴ سویه باکتری مقاوم TPS1، TPS2، TPS3 و TPS4 در محیط "Nic-medium broth" حاوی ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین

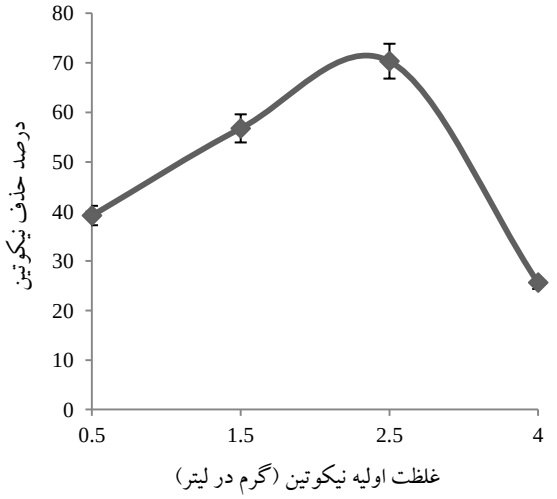


شکل ۲- (الف): باند الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن *16S rRNA* باکتری تجزیه کننده نیکوتین (۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۲: سویه TPS2 و ۳: کنترل منفی). (ب): درخت فیلوژنیک بر اساس توالی ژن *16S rRNA* سویه باکتری TPS2 و توالی‌های ۱۱ سویه به دست آمده از بانک ژنی (درخت یاد شده بر اساس الگوریتم neighbor-joining و به کمک نرم افزار MEGA.6 ترسیم شد. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده شماره دسترسی سویه‌های باکتری ثبت شده در GenBank است).

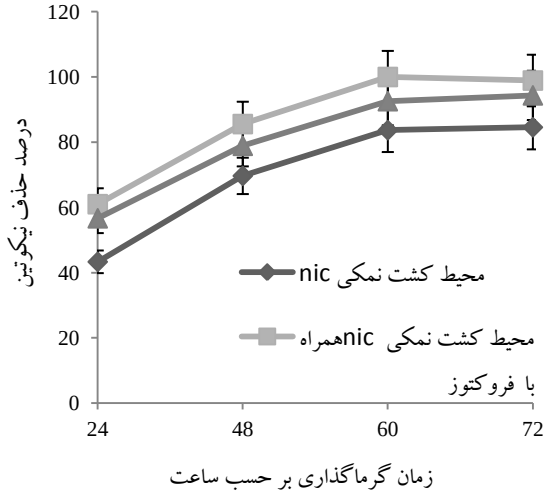
بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعات فنوتیپیک و تحلیل فیلوژنیک، سویه TPS2 به عنوان باکتری متعلق به جنس *سیتروباکتر* تشخیص داده شد. این سویه برای مطالعات نیکوتین‌زدایی در شرایط سلول‌های رویشی انتخاب شد.

نتایج حذف زیستی نیکوتین در *سیتروباکتر* سویه TPS2: همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، اثر غلظت‌های ۰/۵ تا ۴ گرم در لیتر نیکوتین روی حذف زیستی آن توسط *سیتروباکتر* سویه TPS2 در محیط پایه نمکی "Nic-medium broth" پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری بررسی شده است. بیش‌ترین میزان حذف نیکوتین (۷۰/۳ درصد) در غلظت ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین مشاهده شده است. با توجه به این‌که حذف نیکوتین در غلظت‌های بالاتر از ۴/۵ گرم در لیتر کاهش پیدا کرده است، نشان دهنده این موضوع است که در غلظت‌های بالاتر نیکوتین فعالیت‌های آنزیماتیکی این سویه باکتری کاهش می‌یابد.

با توجه به این‌که انتخاب منابع کربن و ازت مناسب به عنوان سوبستراهای کمکی می‌تواند در حذف زیستی نیکوتین بسیار مهم باشد، اثر منابع کربن و ازت مختلف بر روی حذف بررسی شد که بر اساس نتایج به دست آمده، از میان منابع کربن، فروکتوز و از بین منابع ازت، عصاره مخمر به عنوان منابع اثرگذار برگزیده شد. در این راستا، مدت دوره حذف نیکوتین با *سیتروباکتر* سویه TPS2 در غلظت بهینه ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین و در حضور ۲/۵ گرم در لیتر فروکتوز و عصاره مخمر در محیط‌های پایه نمکی بررسی شد (شکل ۴). همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، بیش‌ترین میزان حذف نیکوتین (۸۳/۶ درصد) در ساعت ۶۰ مشاهده شد. این در حالی است که زمانی که نیکوتین همراه با ۲/۵ گرم در لیتر فروکتوز به عنوان منبع کربن کمکی استفاده شده است ماکزیمم حذف نیکوتین (در حدود ۱۰۰ درصد) در ساعت ۶۰ مشاهده شد. اضافه کردن ۲/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر به عنوان منبع ازت کمکی به حذف ۹۲/۵ درصدی نیکوتین پس از ۶۰ ساعت گرماگذاری منجر شده است.



شکل ۳- نمودار اثر غلظت‌های اولیه نیکوتین بر روی حذف آن در *سیتروباکتر* سویه TPS2 در محیط پایه نمکی حاوی نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و ازت و در دمای گرماگذاری ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دور شیکر ۱۸۰ rpm و پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری. نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار ۱± معرف انحراف معیار است.



شکل ۴- اثر زمان گرماگذاری در حذف نیکوتین توسط *سیتروباکتر* سویه TPS2 در محیط پایه نمکی Nic-medium broth دارای ۲/۵ گرم در لیتر نیکوتین و یا به همراه ۲/۵ گرم در لیتر فروکتوز و عصاره مخمر در شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۸۰ rpm. نتایج ارایه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار ۱± معرف انحراف معیار است.

بحث و نتیجه‌گیری

نیکوتین به‌طور گسترده در صنایع مختلف به ویژه صنایع توتون و تنباکو به کار برده می‌شود. حضور نیکوتین سمی در ضایعات و پسماندهای حاصل از تولید تجاری توتون می‌تواند آثار مخرب زیست محیطی را به همراه داشته باشد، زیرا نیکوتین می‌تواند به سهولت به زمین‌های اطراف و آب‌های سطحی و زیرزمینی راه یافته و در پی آن آثار زیان‌بار بر سلامت انسان و اکوسیستم‌های طبیعی داشته باشد (۴). از طرفی چنانچه زباله‌های صنایع مرتبط با نیکوتین عاری و یا دارای محتوای نیکوتین پایین باشد، می‌تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب و ارزان قیمت در تولید فرآورده‌های زیست فناوری از جمله بیوگاز استفاده شوند. در حالی که از روش‌های فیزیکی- شیمیایی مختلفی از جمله استخراج به کمک حلال‌های آلی در شرایط قلیا، تقطیر در خلاء و روش آب داغ برای کاهش سمیت نیکوتین در محلول‌های آبی استفاده شده است (۳، ۶ و ۷)، با این وجود، این روش‌ها دارای محدودیت هایی از قبیل سمیت بالا به علت باقی ماندن حلال‌های سمی، هزینه‌های عملیاتی بالا و حذف غیر اختصاصی است. از این رو برای سم‌زدایی نیکوتین مناسب نیست (۱۹). بنابراین، تمایل به توسعه روش‌های حذف زیستی نیکوتین متکی بر میکروارگانیسم‌ها به عنوان بیوکاتالیست‌های اقتصادی کارآمد و سازگار با محیط زیست افزایش یافته است. محتوای آنزیمی بالا و تنوع مسیرهای متابولیسمی در میکروارگانیسم‌ها از ویژگی‌های برجسته‌ایی است که باعث شده تا بسیاری از پژوهشگران سویه‌های میکروبی تجزیه کننده نیکوتین با قابلیت مصرف نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن، ازت و انرژی را غربال‌گری و تعیین هویت کنند. با توجه به

سمیت بالای نیکوتین برای میکروارگانیسم ها، غربال‌گری سویه‌های میکروبی با تحمل‌پذیری ذاتی بالا ما را قادر می‌سازد که سویه‌های بومی کارآمدی را برای حذف و تجزیه نیکوتین جداسازی کنیم. در این راستا، ۲۰ سویه باکتری با قابلیت تجزیه کنندگی نیکوتین از مزارع زیر کشت تنباکو در محیط‌های پایه نمکی حاوی نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن، ازت و انرژی، با روش غنی‌سازی جداسازی و الگوی مقاومت آن‌ها نسبت به نیکوتین ارزیابی شد. در میان سویه‌های باکتری تجزیه کننده نیکوتین، سویه TPS2 حداکثر مقاومت و تجزیه‌کنندگی را نسبت به نیکوتین نشان داد (جدول ۳ و شکل ۱). سویه باکتری TPS2 با توجه به ویژگی‌های فنوتیپیک و تجزیه و تحلیل فیلوژنیک به عنوان *سیتروباکتر* شناسایی و تعیین هویت شد (شکل ۲). تا به امروز گزارش‌هایی از کاربرد سویه‌های باکتری متعلق به جنس *سیتروباکتر* در اصلاح و پاک‌سازی زیستی انواع آلاینده‌های محیطی از جمله تجزیه زیستی اسید تانیک، فرآیند حذف کروزول، تجزیه زیستی رنگ‌های آزو، اصلاح زیستی اکسی آنیون سمی سلنات، تجزیه سورفاکتانت‌های آنیونی و حذف سولفات از پسماندهای صنعتی منتشر شده است (۲۵). با این حال، مطالعه پیش رو، نخستین گزارش در مورد تجزیه نیکوتین به وسیله جنس *سیتروباکتر* است. در ادامه این پژوهش، سلول‌های رویشی *سیتروباکتر* سویه TPS2 برای بررسی توانایی تجزیه نیکوتین در غلظت‌های مختلف کافئین و در حضور منابع کربن و ازت کمکی در محیط‌های پایه نمکی بررسی شد. با توجه به اینکه تجزیه زیستی نیکوتین از طریق مسیرهای متابولیکی غیر از گلیکولیز رخ می‌دهد و ATP تشکیل نمی‌شود، اضافه کردن سوبستراهای کمکی اعم از منابع ازت و کربن کمکی، به عنوان یک منبع کمکی انرژی، احتمالا می‌تواند در بهبود فرآیند تجزیه زیستی نیکوتین مؤثر باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، ۱۰۰ درصد نیکوتین با غلظت اولیه ۲/۵ گرم در لیتر و در حضور ۲/۵ گرم در لیتر فروکتوز، بعد از ۶۰ ساعت گرماگذاری توسط باکتری بومی یاد شده حذف شد (شکل‌های ۳ و ۴). نخستین تجزیه میکروبی نیکوتین در گونه باکتری *آرتروباکتر اکسیدانس*[۲۵] گزارش شد. باکتری یاد شده قابلیت استفاده از نیکوتین را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی دارا بود (۱۰). سویه‌ایی از باکتری *سودوموناس* گزارش شد که قادر به تجزیه نیکوتین در غلظت ۱/۳ گرم در لیتر با راندمان ۹۹/۶ درصدی پس از ۲۵ ساعت گرماگذاری بود (۱۵). گونگ[۲۶] و همکارانش (۲۰) نیکوتین‌زدایی را با استفاده از سویه باکتری متعلق به رودوکوکوس که قادر به تجزیه کامل نیکوتین در غلظت ۱ گرم در لیتر بعد از ۵۲ ساعت گرماگذاری و در شرایط بهینه شه از نظر شاخص‌های محیطی بود را توسعه دادند. یک سویه از *آگروباکتریوم* که نسبت به نیکوتین مقاوم بود، جداسازی شد که پس از بررسی‌های انجام شده حذف ۱۰۰ درصدی نیکوتین با غلظت اولیه ۱ گرم در لیتر پس از ۶ ساعت گرماگذاری و در شرایط بهینه شده کشت مشاهده شد (۹). سویه باکتری متعلق به جنس *آسینتوباکتر* در شرایط بهینه شده از نظر دما، اسیدیته و دور شیکر، قادر به تجزیه ۱۰۰ درصدی نیکوتین در غلظت بهینه ۱ گرم در لیتر است (۸). در جدیدترین مطالعه انجام شده توسط لیو و همکاران (۱۹) گونه باکتری غربال‌گری شده *سودوموناس جنیکولاتا*[۲۷]، با قابلیت مصرف نیکوتین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، در دمای بهینه ۳۰ درجه، اسیدیته بهینه برابر ۶/۵ و دور شیکر بهینه ۱۲۰ rpm قابلیت حذف کامل

نیکوتین در غلظت اولیه ۱/۵ گرم در لیتر را پس از ۴ روز گرماگذاری داشت. در مقایسه با مطالعات گذشته، نتایج آزمایش‌های حاضر که با استفاده از سلول‌های رویشی *سیتروباکتر* سویه TPS2 بدون انجام فرآیندهای بهینه‌سازی آماری انجام شد، حذف منطقی نیکوتین را نشان داد. شایان ذکر است نتایج به دست آمده بدون بهینه‌سازی شاخص‌های محیطی کشت (دما، اسیدیته و دور شیکر) و سایر شاخص‌های احتمالی مؤثر از جمله اثر حجم مایه تلقیح، اثر یون‌های فلزی، تعیین سطح بهینه شاخص‌های تغذیه‌ای میکروارگانیسم و بررسی میان کنش‌ها به دست آمده است که همین امر توانایی سلول رویشی باکتری بومی یاد شده را به عنوان بیوکاتالیست برای حذف و پاک‌سازی زیستی نیکوتین از محیط‌های آلوده تأیید می‌کند. با توجه به روند رو به توسعه صنایع مرگبار توتون در کشور، عدم مدیریت زیست محیطی و بنابراین، انتشار نیکوتین سمی به اکوسیستم‌های طبیعی، باکتری بومی غربال‌گری شده *سیتروباکتر* سویه TPS2 را می‌توان به عنوان یک بیوکاتالیست پاک در تجزیه نیکوتین از محیط زیست و پاک‌سازی آن معرفی کرد. استفاده عملی از باکتری یاد شده برای پالایش زیستی پساب‌های آلوده در مقیاس‌های بالاتر (Scale-up)، نیازمند انجام فرآیندهای بهینه‌سازی و شناسایی ساز و کار آنزیمی تجزیه کننده نیکوتین است. افزون بر این، می‌توان ایجاد همزیستی بین باکتری بومی *سیتروباکتر* سویه TPS2 و گیاهان جنس نیکوتینا و بررسی محتوای نیکوتین این گیاهان بعد از یک دوره تیمار مشخص با هدف کاهش غلظت نیکوتین در گیاهان یاد شده را پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

این پروژه در قالب طرح پژوهشی به شناسه ۴/۴۱۹۸۳/۱۳۹۳ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان انجام گرفته است. بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Armstrong DW., Wang X., Ercal N. Enatiomeric composition of nicotine in smokeless tobacco, medicinal products, and commercial reagents. *Chiriality* 1998; 10 (7): 587- 91.

(2) Sabha M., Tanus-Santos JE., Toledo JC., Cittadino M., Rocha JC., Moreno H. Transdermal nicotinemimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000; 68 (2): 167- 74.

(3) Soloway SB. Naturally occurring insecticides. *Environmental Health Perspectives* 1976; 14 (2): 109- 17.

(4) Lei LP., Zhang W., Wei HL., Xia ZY., Liu XZ. Characterization of a novel nicotine-degrading *Ensifer* sp. strain N7 isolated from tobacco rhizosphere. *Annals of Microbiology* 2009; 59 (2): 247- 52.

(5) Li HJ., Li XM., Duan YQ., Zhang KQ., Yang JK. Biotransformation of nicotine by microorganism: the case of *Pseudomonas* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 86 (1): 11-7.

(6) Civilini M., Domenis C., Sebastianutto N., Bertoldi M. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by microorganisms. *Waste Management and Research* 1997; 15 (4): 349- 58.

(7) Meher KK., Panchwagh AM., Rangrass S., Gollakota KG. Biomethanation of tobacco waste. *Environmental Pollution* 1995; 90 (2): 199- 202.

(8) Li HJ., Duan YQ., Ma GH., Lei LP., Zhang KQ., Yang JK. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. ND12 capable of degrading nicotine. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5 (11): 1335- 41.

(9) Wang SN., Liu Z., Xu P. Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain S33. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 107 (3): 838- 47.

(10) Sguros PL. Microbial transformations of the tobacco alkaloids. I. Cultural and morphological characteristics of a nicotinophile. *Journal of Bacteriology* 1955; 69 (1): 28- 37.

(11) Kodama Y., Yamamoto H., Amano N., Amachi T. Reclassification of two strains of *Arthrobacter* oxidans and proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 1992; 42 (2): 234- 9.

(12) Gravely LE., Geiss VL., Gregory., CF. Process for reduction of nitrate and nicotine content of tobacco by microbial treatment. US patent 4557280; 1978.

(13) Yuan YJ., Lu ZX., Huang., LJ., Li Y., Lu FX., Bie XM., et al. Biodegradation of nicotine from tobacco waste extract by *Ochrobactrum intermedium* DN2. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2007; 34 (8): 567- 70.

(14) Wang SN., Xu P., Tang HZ., Meng J., Liu XL., Huang J., et al. Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters* 2004; 26 (19): 1493- 6.

(15) Ruan AD., Min H., Peng X., Huang Z. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. *Research in Microbiology* 2005; 156 (5): 700- 6.

(16) Wang SN., Liu Z., Tang HZ., Meng J., Xu P. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. *Microbiology* 2007; 153 (5): 1556- 65.

(17) Chen CM., Li XM., Yang JK., Gong XW., Li B., Zhang KQ. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic 22., and its potential application in tobacco processing. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2008; 62 (3): 226- 31.

(18) Wang HH., Yin B., Peng XX., Wang JY., Xie ZH., Gao J., et al. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites. *Journal of Applied Microbiology* 2012; 112 (2): 258- 68.

(19) Liu Y., Wang L., Huang K., Wang W., Nie X., Jiang Y., et al. Physiological and biochemical characterization of a novel nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas geniculata* N1. *PLOS ONE*; 2014; 9 (1): e84399.

(20) Gong XW., Yang JK., Duan YQ., Dong JY., Zhe W., Wang L., et al. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing. *Research in Microbiology* 2009; 160 (3): 200- 4.

(21) Wiegand I., Hilpert K., Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2008; 3(2): 163- 75.

(22) Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., Staley JT., Williams ST. Bergey‘s manual of determinative bacteriology.9th ed. Baltimore, Maryland; Williams and Wilkins; 1994.

(23) Leong DU., Greisen KS. PCR detection of bacteria found in cerebrospinal fluid. In: Persing DH., Smith TF., Tenover FC and White TJ. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Mayo Foundation, Rochester; 1993.

(24) Tamura K., Stecher., G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30 (12): 2725- 9.

(25) Ren Y., Peng L., Zhao G., Wei C. Degradation of *m*-cresol via the *ortho* cleavage pathway by *Citrobacter farmeri* SC01. *Biochemical Engineering Journal* 2014; 88: 108- 14.

---

[1]- *Nicotina tabacum* L.
[2]- *Acinetobacter*
[3]- *Agrobacterium*
[4]- *Arthrobacter*
[5]- *Cellulomonas*
[6]- *Ensifer*
[7]- *Ochrobactrum*
[8]- *Pseudomonas*
[9]- *Rhodococcus*
[10]- *Citrobacter*
[11]- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
[12]- E. Merck, Darmstadt, Germany
[13]- Nutrient Agar
[14]- Kardanazma company, Iran
[15]- Quelab, UK
[16]- Liu
[17]- Agar dilution method
[18]- Cinna Pure ™ KIT
[19]- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
[20]- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin
[21]- http://www.megasoftware.net/mega.php
[22]- JASCo Pu 980
[23]- Retention time
[24]- *E. coli*
[25]- *Arthrobacter oxidans*
[26]- Gong
[27]- *Pseudomonas geniculata*

Isolation and Screening of a native *Citrobacter* sp. with high nicotine-tolerant and its application as a biocatalyst for biodegradation of nicotine

Morahem Ashengroph *
Assistant Professor of Microbiology, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir

Abstract

Introduction: Nicotine is a toxic plant alkaloid and it has been designated as hazardous by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) since 1994. The present work was directed to screen nicotine resistant bacteria, that is used as biocatalyst in the biodegradation of nicotine from contaminated sites.

Materials and methods: Collected soil samples from 12 tobacco farms were selected as target sites for sampling. Enrichment nicotine-degrading bacteria were performed in minimal salt media containing nicotine as the sole carbon and nitrogen sources. Agar dilution plate method was performed for determining intrinsic tolerance of bacterial isolates to nicotine. Phenotypic characterization and phylogenetic analysis were used to identify the selected bacterial isolate able to degrade nicotine. To determine the optimal conditions for the bio-removal of nicotine, the effects of initial nicotine concentration, incubation time and the addition of carbon and nitrogen sources in the selected strain were tested. The quantification of residual nicotine in the culture media was measured by high performance liquid chromatography (HPLC).

Results: Among 20 bacterial isolates for degradation of nicotine, the strain TPS2 showed a high level of resistance and degradation efficiency. Results of phenotypic identification and phylogenetic analysis showed the native strain TPS2 belongs to the *Citrobacter* sp. strain TPS2 (GeneBank accession no. KM110046). According to the results of de-nicotination experiment, the native strain TPS2 is able to remove 100% of nicotine with an initial concentration 2.5 g/l in the presence of 2.5 g/l fructose.

Discussion and conclusion: The results showed that the screened Citrobacter sp. was suitable candidate for degradation of nicotine from wastewater and sites that contaminated with nicotine. It is seemed by using of the microbial biocatalyst the ecosystem contamination of toxic nicotine can be decreased. The present work is the first report on the degradation of nicotine by native microorganisms.

Key words: Biocatalyst, *Citrobacter* sp., Intrinsic tolerance pattern, Nicotine degradation

* Corresponding author
Received: August 25, 2014 / **Accepted:** February 18, 2015