

# 一株麦斯明降解菌申氏菌 G-2 的筛选、鉴定及降解途径预测

高辉<sup>1</sup>, 喻梦梦<sup>1</sup>, 张入匀<sup>1</sup>, 贾玮<sup>1</sup>, 张希<sup>2</sup>, 付博<sup>1</sup>, 许自成<sup>1</sup>, 郭志刚<sup>2\*</sup>, 党炳俊<sup>1\*</sup>

1 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州

2 陕西中烟工业有限责任公司, 陕西 西安

高辉, 喻梦梦, 张入匀, 贾玮, 张希, 付博, 许自成, 郭志刚, 党炳俊. 一株麦斯明降解菌申氏菌 G-2 的筛选、鉴定及降解途径预测[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 5074-5091.

GAO Hui, YU Mengmeng, ZHANG Ruyun, JIA Wei, ZHANG Xi, FU Bo, XU Zicheng, GUO Zhigang, DANG Bingjun. Isolation, characterization, and degradation pathway prediction of a myosmine-degrading bacterial strain *Shinella* G-2[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(11): 5074-5091.

**摘要:** 麦斯明, 即 3-(3,4-二氢-2H-吡咯-5-基)吡啶, 是一种烟草生物碱。它不仅存在于烟草中, 还广泛分布于各类食品、水果和蔬菜里。麦斯明是生成致癌性烟草特有亚硝胺 *N*-亚硝基降烟碱 (*N*-nitrosonornicotine, NNN) 的前体物之一, 对人体健康构成潜在威胁。【目的】筛选具有降解麦斯明能力的菌株, 并探究其降解麦斯明的途径及机制。【方法】以麦斯明为唯一碳源, 从植烟土壤中富集和筛选麦斯明降解菌。采用形态学观察、生理生化鉴定与分子生物学鉴定相结合的方法对麦斯明降解菌株进行分类学鉴定。利用高效液相色谱(HPLC)和超高效液相色谱-质谱联用(UHPLC-MS/MS)技术分析菌株降解麦斯明的中间代谢产物。通过 BLAST 工具预测烟碱降解基因。【结果】筛选获得一株具有降解麦斯明能力的菌株 G-2, 经分析该菌株隶属于申氏菌属 (*Shinella*), 将其命名为 *Shinella* sp. G-2。HPLC 和 UHPLC-MS/MS 分析麦斯明降解产物样品, 鉴定出 5 种代谢产物。基因组分析显示, 菌株 G-2 含有一个吡啶和吡咯烷交叉途径(a variant of the pyridine and pyrrolidine pathway, VPP 途径)基因簇的同源基因簇。【结论】本研究筛选分离出一株具有麦斯明降解能力的菌株 *Shinella* sp. G-2。菌株 G-2 可能利用 VPP 途径中的酶类, 通过类似于 VPP 途径的代谢途径降解麦斯明。

**关键词:** *Shinella* sp. G-2; 麦斯明; 降解产物; 降解途径

资助项目: 陕西中烟工业有限责任公司科技项目(BA000-ZB23007); 河南农业大学青年英才项目(30500568)

This work was supported by the Science and Technology Project of China Tobacco Shaanxi Industrial Co., Ltd. (BA000-ZB23007) and the Young Talents Foundation of Henan Agricultural University (30500568).

\*Corresponding authors. E-mail: GUO Zhigang, guozhigang\_83@163.com; DANG Bingjun, dangbingjun@henau.edu.cn

Received: 2025-04-12; Accepted: 2025-07-10; Published online: 2025-08-04

# Isolation, characterization, and degradation pathway prediction of a myosmine-degrading bacterial strain *Shinella* G-2

GAO Hui<sup>1</sup>, YU Mengmeng<sup>1</sup>, ZHANG Ruyun<sup>1</sup>, JIA Wei<sup>1</sup>, ZHANG Xi<sup>2</sup>, FU Bo<sup>1</sup>, XU Zicheng<sup>1</sup>, GUO Zhigang<sup>2\*</sup>, DANG Bingjun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

<sup>2</sup> China Tobacco Shaanxi Industrial Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi, China

**Abstract:** Myosmine, also known as 3-(3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl) pyridine, is a tobacco alkaloid found not only in tobacco but also in various foods, fruits, and vegetables. It serves as one of the precursors for the formation of the carcinogenic tobacco-specific nitrosamine *N'*-nitrosornicotine, posing a potential threat to human health. **[Objective]** To screen bacterial strains capable of degrading myosmine and preliminarily explore the pathways and mechanisms underlying myosmine degradation. **[Methods]** We used myosmine as the sole carbon source to enrich and isolate the myosmine-degrading bacterial strain from tobacco-growing soil. Taxonomic identification of this myosmine-degrading strain was achieved by a combination of morphological observation, physiological and biochemical testing, and molecular analysis. The myosmine degradation products by this strain were analyzed by HPLC and UHPLC-MS/MS. The degradation genes were predicted by BLAST comparison. **[Results]** A strain G-2 capable of degrading myosmine was successfully isolated. The strain was identified as a member of *Shinella*, designated *Shinella* sp. G-2. HPLC and UHPLC-MS/MS identified five degradation products. Genomic analysis showed that strain G-2 possessed a homologous gene cluster of a variant of the pyridine and pyrrolidine pathway (VPP) gene cluster. **[Conclusion]** In this study, a strain *Shinella* sp. G-2 with the ability to degrade myosmine was isolated. Strain G-2 might use enzymes in the VPP pathway to degrade myosmine through a metabolic pathway similar to the VPP pathway.

**Keywords:** *Shinella* sp. G-2; myosmine; degradation products; degradation pathway

烟草是我国一类重要的经济作物,其体内蕴含丰富的生物碱成分。截至目前,已在烟草中鉴定出近50种不同的烟草生物碱<sup>[1]</sup>。烟草生物碱会与硝酸盐、亚硝酸盐反应形成一系列烟草特有亚硝胺(tobacco-specific N-nitrosamines, TSNAs),该反应过程主要发生在鲜叶采收后的晾晒、调制、陈化等环节<sup>[2-3]</sup>。目前已识别出8种烟草特有亚硝胺,其中*N'*-亚硝基降烟碱(*N'*-nitrosornicotine, NNN)、4-(*N'*-亚硝基甲基氮)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮[4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK]、*N'*-亚硝基假木贼

碱(*N'*-nitrosoanabasine, NAB)、*N'*-亚硝基新烟草碱(*N'*-nitrosoanatabine, NAT)这4种研究较多<sup>[4-5]</sup>。NNN和NNK已被世界卫生组织国际癌症研究机构明确归类为I类致癌物<sup>[6]</sup>,研究发现它们会增加患肺癌、喉癌、口腔癌等多种癌症的风险<sup>[7-10]</sup>。生成NNK的前体物质是烟碱,烟碱也可作为前体物生成NNN<sup>[11-12]</sup>。烟碱去甲基化生成的降烟碱同样是形成NNN的前体物质。在普通栽培烟草中烟碱占生物碱总含量的93%以上,而降烟碱含量相对较少,一般不超过总生物碱含量的3.5%<sup>[13]</sup>。然而,在栽培烟草中存在一种

特殊的基因突变植株——“转化株”，在转化株中烟碱在烟碱去甲基化酶的催化作用下转化为降烟碱，这一转化过程显著降低了烟碱含量，增加了降烟碱、NNN、麦斯明的含量<sup>[14]</sup>。由烟碱转化导致降烟碱含量增加对烟叶安全性有重要影响。除了烟碱和降烟碱外，麦斯明也是生成NNN的前体物之一<sup>[15]</sup>。此外，麦斯明本身具有遗传毒性。研究表明它对多种人体细胞具有遗传毒性效应，如人类淋巴细胞、上呼吸道上皮细胞、人食管腺癌细胞系等<sup>[16-17]</sup>。麦斯明虽然在烟草中的含量通常较低，但它不仅存在于烟草中，还广泛分布于各种食品、水果和蔬菜中，同样对人体健康构成潜在威胁<sup>[18]</sup>。

鉴于烟碱以及与之相关的烟草特有亚硝胺的危害，烟碱的微生物代谢一直是研究热点。早在20世纪50年代，科学家们就已开始研究烟碱的微生物降解代谢。Wada<sup>[19]</sup>成功从土壤样本中筛选出能够以烟草生物碱为唯一碳源和氮源进行生长的细菌，这些细菌可分为2种类型：类型A的菌株具有降解烟碱的能力；类型B的菌株不仅具有降解烟碱的能力，还具有降解降烟碱和假木贼碱的能力。经过持续研究，目前已分离鉴定出种类繁多的具有降解烟碱能力的微生物，这些微生物多属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[20]</sup>、节杆菌属(*Arthrobacter*)<sup>[21]</sup>、农杆菌属(*Agrobacterium*)<sup>[22]</sup>、红球菌属(*Rhodococcus*)<sup>[23]</sup>、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)<sup>[24]</sup>、苍白杆菌属(*Ochroactrum*)<sup>[25]</sup>等。烟碱降解微生物不仅种类繁多，其代谢烟碱的途径也多种多样。目前，已阐明的代谢途径主要有4条，分别是吡啶途径(pyridine pathway)<sup>[26]</sup>、吡咯烷途径(pyrrolidine pathway)<sup>[27-28]</sup>、吡啶和吡咯烷交叉途径(pyridine and pyrrolidine pathway, VPP途径)<sup>[29-30]</sup>和脱甲基途径(demethylation pathway)<sup>[31]</sup>。在已分离鉴定的烟碱降解菌株中部分菌株已得到应用，包括用于烟草废水处理、用于烟叶品质提升以及用于药物中间体制备等。例如，从烟草废弃物污染的土壤中分离出的烟

碱降解菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) HF-1，在投加到活性污泥后能够成功定殖，并有效去除烟草废水中的烟碱<sup>[32]</sup>；从植烟土壤中分离出的烟碱降解菌株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) Nic22，将其制成粗酶液喷洒于烟叶表面能够调节烟叶原料的烟碱含量，改善烟叶品质<sup>[33]</sup>；从植烟土壤中分离出的烟碱降解菌株恶臭假单胞菌(*P. putida*) S16经过基因工程改造，构建了编码3-琥珀酰吡啶单加氧酶(3-succinoylpyridine monooxygenase)基因的插入失活突变株恶臭假单胞菌(*P. putida*) S16dspm，该突变株作为生物催化剂可用于制备降压药前体物3-琥珀酰吡啶<sup>[34]</sup>。

尽管文献已报道了许多烟碱降解菌株并对其代谢途径进行了深入研究，但针对降烟碱和麦斯明的降解菌株及其代谢途径的研究仍然相对匮乏。目前，已分离鉴定出的具有降解降烟碱能力的菌株仅有申氏菌(*Shinella* sp.) HZN7<sup>[35]</sup>、节杆菌(*Arthrobacter* sp.) NOR5<sup>[36]</sup>和分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium* sp.) SMGY-1XX<sup>[37]</sup>。相较于降烟碱，已分离鉴定出的麦斯明降解菌株更少，目前已知的仅有分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium* sp.) SMGY-1XX和鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis* sp.) J-6<sup>[38]</sup>。菌株分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium* sp.) SMGY-1XX通过吡啶途径降解麦斯明，而菌株鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis* sp.) J-6则利用VPP途径进行降解。此外，鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis* sp.) J-6还拥有一条此前未在微生物中报道过的烟草生物碱代谢途径。在该途径中，麦斯明被转化为3-琥珀酰吡啶(3-succinoyl-pyridine)，并最终被代谢为3-吡啶乙酸(3-pyridylacetic acid)。然而，目前已知的麦斯明降解菌株数量仍然有限，对其降解途径与分子机制的理解仍不充分。因此，新的麦斯明降解菌株及其降解途径仍有待进一步探索与发现。

本研究从植烟土壤中筛选分离出一株具有降解麦斯明能力的菌株，对其进行基因组测序，鉴定了其在麦斯明代谢过程中产生的中间产物，

并推测了其降解麦斯明的代谢途径。通过本研究,一方面为烟草生物碱的微生物降解提供了新的菌种资源,另一方面深化了对烟草生物碱的微生物代谢途径及机制的理解。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土壤来源

供试土壤样品为实验室-20 °C保存的烟草根际土壤<sup>[39]</sup>。

#### 1.1.2 培养基

LB 液体培养基、矿物盐培养基(mineral salts medium, MSM)和 R2A 琼脂培养基的配制参考文献[38,40]。LB 液体培养基和矿物盐培养基在 121 °C 灭菌 30 min 后使用, R2A 琼脂培养基在 121 °C 灭菌 20 min 后使用。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

麦斯明,上海毕得医药科技有限公司;麦斯明标准品:用去离子水配制浓度为 500 mg/mL 的母液,并用 0.22 μm 水系滤膜过滤除菌。3-琥珀酰吡啶,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;3-琥珀酰吡啶标准品:用去离子水配制浓度为 1.25 mg/mL 母液,并用 0.22 μm 水系滤膜过滤除菌。色谱级甲醇,天津市四友精细化学品有限公司;胰蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;酵母粉, Oxoid 公司; NaCl, 国药集团化学试剂有限公司; API ZYM、API 20NE 试剂盒,生物梅里埃公司。

冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;低温冷冻离心机, Eppendorf 公司;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司;高效液相色谱仪,沃特世科技有限公司;液质联用仪, ThermoFisher Scientific 公司。

### 1.2 麦斯明降解菌株的筛选

称取约 5 g 土壤样品,放入装有 100 mL 含 500 mg/L 麦斯明的 MSM 培养基的锥形瓶中, 30 °C、160 r/min 培养 7 d 后,取 5 mL 富集菌

液,加入新的装有 100 mL 含 500 mg/L 麦斯明的 MSM 培养基中。重复上述步骤 4 次,将得到的富集菌液用稀释涂布平板法涂布在平板上,并置于 30 °C 的恒温恒湿箱中培养。待平板上长出单菌落后,挑取单菌落进行划线纯化。

将纯化后得到的单菌落分别接入装有 100 mL 含 500 mg/L 麦斯明的 MSM 培养基的锥形瓶中, 30 °C、160 r/min 培养。若培养基的颜色或浑浊度发生明显变化,则对相应锥形瓶的菌液进行 HPLC 分析,以判断其是否具有降解麦斯明的能力。

### 1.3 麦斯明降解菌株降解麦斯明的中间代谢产物分析鉴定

将筛选出的麦斯明降解菌株接种到 LB 液体培养基中培养至浑浊。取菌液在 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min,弃上清留菌体沉淀后再加入新 MSM 溶液进行重悬洗涤,重复 2 次。将洗涤完的菌悬液调至  $OD_{600}=0.6$ ,以菌悬液的体积分数为 1% 的比例接入含 500 mg/L 麦斯明的 MSM 培养基中,摇匀后将锥形瓶置于 30 °C、160 r/min 条件下培养 15 d。取培养液在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 水系滤膜并进行冷冻干燥,收集冻干粉末,加色谱级甲醇溶解,过 0.45 μm 尼龙滤膜后得到麦斯明降解产物样品,对其进行 HPLC 分析和 UHPLC-MS/MS 分析<sup>[38]</sup>。

HPLC 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm, Waters 公司),流动相是 20 mmol/L  $KH_2PO_4$  (pH 2.6)和甲醇(97:3, 体积比)的混合物,柱温为 30 °C,流速为 1.0 mL/min,进样量为 10.0 μL,检测波长为 268 nm。

UHPLC 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3.0 μm, Waters 公司)。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇,采用梯度洗脱方法,梯度洗脱条件为:0–2 min, 95% A; 2–6 min, 95%–85% A; 6–10 min, 85%–50% A; 10–15 min, 50% A; 15–16 min, 50%–95% A; 16–20 min, 95% A。柱温为 30 °C,流速为 0.4 mL/min,进样量为 10.0 μL。

采用 HESI 作为离子源, 正离子模式, 扫描模式为 full ms/dd-ms<sup>2</sup> top10。一级扫描的分辨率为 70 000, 扫描范围为 50–600 *m/z*; 二级扫描的分辨率为 17 500, 起始离子为 50 *m/z*。鞘气速率设置为 40 arb, 辅助气速率为 10 arb, 喷雾电压为正离子 4.0 kV。毛细管温度为 320 °C, 喷针温度为 250 °C, S-lens 设置为 50%。碎裂方式为高能碰撞解离 (higher energy collision dissociation, HCD), 碎裂能量分别设置为 15、30 和 45。

#### 1.4 麦斯明降解菌株的全基因组测序

将筛选得到的具有降解麦斯明能力的菌株接种到 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养, 待培养基浑浊后, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体沉淀, 送至深圳华大基因科技有限公司, 通过 DNBSEQ 平台进行全基因组测序。原始测序数据下机后对其进行过滤, 获得可用的 clean data, 然后使用 SPAdes v3.9.0 组装软件对 clean data 进行组装。组装后获得的序列上传至 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 获得 GenBank 登录号为 JBBEYH000000000, 使用 prokaryotic genome annotation pipeline (PGAP) 进行基因预测及基因功能注释。

#### 1.5 麦斯明降解菌株的鉴定

采用 API ZYM 和 API 20NE 试剂盒对菌株 G-2 进行生理生化指标测定, 具体操作根据试剂盒说明书进行。

从降解菌株的基因组注释文件中找到其 16S rRNA 基因序列, 上传至 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net>), 通过 BLAST 工具比对得到降解菌株的 16S rRNA 基因同源序列, 在 MEGA 11.0 软件中采用邻接法构建系统发育树, bootstrap 值设定为 1 000。

平均核苷酸一致性值 (average nucleotide identity, ANI 值) 采用 OAT (orthologous ANI tool) 软件进行计算<sup>[41]</sup>。

DNA-DNA 分子杂交值 (digital DNA-DNA hybridization, dDDH 值) 使用在线工具 genome-to-genome distance calculator (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de/>) 计算获得。

#### 1.6 麦斯明降解菌株的烟碱降解基因预测

通过 BLAST 工具将菌株 G-2 的编码蛋白序列与已报道的菌株噬尼古丁节杆菌 (*A. nicotinovorans*) pAO1 (吡啶途径)、菌株恶臭假单胞菌 (*P. putida*) S16 (吡咯烷途径)、菌株根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) S33 和菌株申氏菌 (*Shinella* sp.) HZN7 (VPP 途径) 的烟碱降解相关酶类进行同源性比对, 鉴定菌株 G-2 中可能参与烟碱降解的相关基因及其编码的同源蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 麦斯明降解菌株 G-2 的筛选及全基因组测序

通过富集、分离和划线纯化从富集菌液中分离出一株 G-2 菌株。该菌株在 R2A 琼脂平板上生长时形态呈灰白色, 表面粗糙干燥、不透明且有褶皱。将菌株 G-2 接入含 500 mg/L 麦斯明的 100 mL MSM 培养基中培养后, 培养液颜色由透明无色变为微黄色, 初步判断菌株 G-2 具有降解麦斯明的能力。

对菌株 G-2 进行全基因组测序, 经组装总共得到 83 个 contigs。菌株 G-2 基因组总长度为 6 073 194 bp, G+C 含量为 64%。预测到基因共 5 839 个, 其中编码基因有 5 717 个, 假基因有 69 个, RNA 基因有 53 个。在 53 个 RNA 基因中 5S rRNA 基因、16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因各 1 个, tRNA 基因 46 个, ncRNA 基因 4 个。

### 2.2 麦斯明降解菌株 G-2 的鉴定

采用 API 20NE 和 API ZYM 试剂盒对菌株 G-2 进行生理生化特性测定。API 20NE 测试结果显示, 菌株 G-2 具有硝酸盐还原能力, 能水解七叶苷, 具有  $\beta$ -半乳糖苷酶活性; 不产生吡嗪, 不能发酵葡萄糖, 无精氨酸二水解酶活性, 不能分解尿素, 也不能水解明胶。菌株 G-2 能

利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-甘露醇、N-乙酰葡萄糖胺、D-麦芽糖、苹果酸和苯乙酸；不能利用葡萄糖酸钾、羊蜡酸、己二酸和柠檬酸三钠。API ZYM 测试结果显示，菌株 G-2 的碱性磷酸盐酶、酯酶(C4)、类脂酯酶(C8)、白氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和 N-乙酰-葡萄糖胺酶呈阳性；类脂酶(C14)、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -糖醛酸苷酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶和  $\beta$ -岩藻糖苷酶呈阴性。

菌株 G-2 的生理生化特征与已报道的 6 株申氏菌属(*Shinella*)模式菌株相似。在 API 20NE

测试中，菌株 G-2 与这 6 株申氏菌属(*Shinella*)模式菌株均能利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-甘露醇、苹果酸、D-麦芽糖和 N-乙酰葡萄糖胺；均不产生吲哚、不能发酵葡萄糖、无精氨酸二水解酶活性、不能利用羊蜡酸且不能水解明胶。在 API ZYM 测试中，菌株 G-2 与这些模式菌株的酯酶(C4)、白氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶均呈阳性；而  $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -糖醛酸苷酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶和  $\beta$ -岩藻糖苷酶均呈阴性。除了上述测试指标外，菌株 G-2 的其他生理生化指标与这 6 株申氏菌属(*Shinella*)模式菌株间有明显差异(表 1)。

表1 菌株G-2与6株*Shinella*属菌株的API 20NE和API ZYM测试结果

Table 1 API 20NE and API ZYM test results between strain G-2 and six *Shinella* strains

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
API 20NE							
硝酸盐还原 Potassium nitrate	+	+	+	-	+	-	+
脲酶 Urea	-	+	-	+	-	+	+
七叶苷水解 Esculin	+						
$\beta$ -半乳糖苷酶 $\beta$ -galactosidase	+						
葡萄糖酸钾 Potassium gluconate	-	-	-	-	+	-	+
己二酸 Adipic acid	-	-	-	-	+	-	-
柠檬酸三钠 Trisodium citrate	-	-	-	-	+	-	-
苯乙酸 Phenylacetic acid	+	-	-	-	-	+	+
API ZYM							
碱性磷酸盐酶 Alkaline phosphatase	+	-	+	+	+	+	+
类脂酯酶(C8) Esterase lipase (C8)	+	-	+	-	-	-	-
类脂酶(C14) Lipase (C14)	-	-	-	+	-	-	-
胱氨酸芳胺酶 Cystine arylamidase	+	-	-	-	+	+	+
胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin	+	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -glucosidase	+	+	+	+	+	+	-
N-乙酰-葡萄糖胺酶 N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	+	-	+	+	-	+	+

1: 菌株G-2; 2: 沉积物申氏菌(*S. sediment*) B3.7<sup>T</sup>; 3: 鸡眼草申氏菌(*S. kummerowiae*) JCM 14778<sup>T</sup>; 4: 弯曲申氏菌(*S. curvata*) JCM 31239<sup>T</sup>; 5: 动胶菌样申氏菌(*S. zoogloeoides*) JCM 20728<sup>T</sup>; 6: 山原申氏菌(*S. yambaruensis*) CCTCC 2011083<sup>T</sup>; 7: 细粒申氏菌(*S. granuli*) JCM 13254<sup>T</sup>。+: 反应阳性; -: 反应阴性。菌株2-7的API 20NE和API ZYM测试结果来自已发表文献[42], 其中的七叶苷水解和 $\beta$ -半乳糖苷酶2项指标文献中未报道。

1: Strain G-2; 2: *S. sedimenti* B3.7<sup>T</sup>; 3: *S. kummerowiae* JCM 14778<sup>T</sup>; 4: *S. curvata* JCM 31239<sup>T</sup>; 5: *S. zoogloeoides* JCM 20728<sup>T</sup>; 6: *S. yambaruensis* CCTCC 2011083<sup>T</sup>; 7: *S. granuli* JCM 13254<sup>T</sup>。+: Positive result; -: Negative result. The API 20NE and API ZYM test results for strains 2-7 were obtained from published literature [42], in which the results for esculin and  $\beta$ -galactosidase were not reported.

通过 EzBioCloud 数据库的 BLAST 工具对菌株 G-2 的 16S rRNA 基因序列进行比对分析。结果显示, 与菌株 G-2 有最高 16S rRNA 基因序列相似度的模式菌株为动胶菌样申氏菌 (*S. zoogloeoides*) ATCC 19623<sup>T</sup>, 相似度为 99.57%, 之后的是鸡眼草申氏菌 (*S. kummerowiae*) CCBAU 25048<sup>T</sup>、湖泊申氏菌 (*S. lacus*) T1A350<sup>T</sup>、弯曲申氏菌 (*S. curvata*) C3<sup>T</sup>、细粒申氏菌 (*S. granuli*) Ch06<sup>T</sup>、褐色申氏菌 (*S. fusca*) DC-196<sup>T</sup> 和山原申氏菌 (*S. yambaruensis*) MS4<sup>T</sup>, 这些菌株的 16S rRNA 基因与菌株 G-2 的 16S rRNA 基因的相似度分别为 99.34%、99.00%、98.44%、98.08%、97.94% 和 97.16%。使用 MEGA 11.0 软件选取菌株 G-2 与 *Shinella* 属已报道的 13 个种模式菌株, 以及作为外参的瓜类鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas melonis*) DAPP-PG 224<sup>T</sup>, 采用邻接法构建系统发育树。如图 1A 所示, 菌株 G-2 与动胶菌样申氏菌 (*S. zoogloeoides*) ATCC 19623<sup>T</sup> 聚为一支, 表明两者具有较近的亲缘关系。

为进一步确定菌株 G-2 的分类地位, 从 NCBI 数据库下载参与系统发育树构建的 7 株申氏菌属 (*Shinella*) 模式菌株基因组序列, 同时下载申氏菌属 (*Shinella*) 中已报道的具有降解烟碱能力的菌株申氏菌 (*Shinella* sp.) HZN7 的基因组序列以进行 ANI 值分析。若 2 菌株之间的 ANI 值高于 95% 则被视为同种<sup>[43]</sup>。由图 1B 可知, 菌株 G-2 与这 8 株菌的 ANI 值均低于 95.00% (84.98%–87.58%)。

在 ANI 值分析的基础上, 进一步对菌株 G-2 与 8 株申氏菌属 (*Shinella*) 菌株进行 dDDH 值计算。dDDH 是细菌物种划分的重要依据: 当 2 株菌之间的 dDDH 值低于 70% 时它们被视为不同种; 反之, 若 dDDH 值高于或等于 70% 则被认为是同种<sup>[44]</sup>。dDDH 值结果如表 2 所示,

菌株 G-2 与这 8 株菌株的 dDDH 值范围在 29.3%–33.8% 之间, 均远低于 70% 的阈值。结合生理生化测试及分子生物学鉴定结果, 判定菌株 G-2 为申氏菌属 (*Shinella*) 的潜在新种, 将菌株 G-2 命名为 *Shinella* sp. G-2。该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 保藏号为 CCTCC M 20251354。

### 2.3 菌株 G-2 降解麦斯明的中间代谢产物分析

通过对麦斯明降解产物样品进行 HPLC 分析观察到多个色谱峰 (图 2A)。其中, 峰 P1 的保留时间为 6.924 min, 与麦斯明标准品的保留时间相一致, 因此推测峰 P1 可能是麦斯明 (图 2A)。峰 P2 的保留时间为 33.205 min, 与 3-琥珀酰吡啶标准品的保留时间相吻合, 推测峰 P2 可能是 3-琥珀酰吡啶 (图 2A、2B)。

进一步对麦斯明降解产物样品进行 UHPLC-MS/MS 分析, 确证了麦斯明和 3-琥珀酰吡啶的存在。UHPLC-MS/MS 分析麦斯明降解产物样品鉴定出 6 种化合物, 包括麦斯明、3-琥珀酰吡啶、假氧化去甲烟碱 (pseudooxy-nornicotine)、6-羟基-麦斯明 (6-hydroxy-myosmine)、6-羟基-3-琥珀酰吡啶 (6-hydroxy-3-succinoylpyridine) 和 2,5-二羟基吡啶 (2,5-dihydroxypyridine)。化合物 C 在正离子模式下所得的质子化分子离子峰为  $m/z$  147.090 8  $[M+H]^+$ , 确定其分子式为  $C_9H_{10}N_2$ 。在其二级质谱图中观察到碎片离子峰  $m/z$  106.028 9、 $m/z$  104.049 6 和  $m/z$  78.034 2, 鉴定化合物 C 为麦斯明 (图 2C)。化合物 F 在正离子模式下所得的质子化分子离子峰为  $m/z$  180.064 5  $[M+H]^+$ , 确定其分子式为  $C_9H_9NO_3$ 。在其二级质谱图中观察到碎片离子峰  $m/z$  134.059 8、 $m/z$  162.054 7、 $m/z$  106.029 0、 $m/z$  78.034 2 和  $m/z$  80.049 9, 鉴定化合物 F 为 3-琥

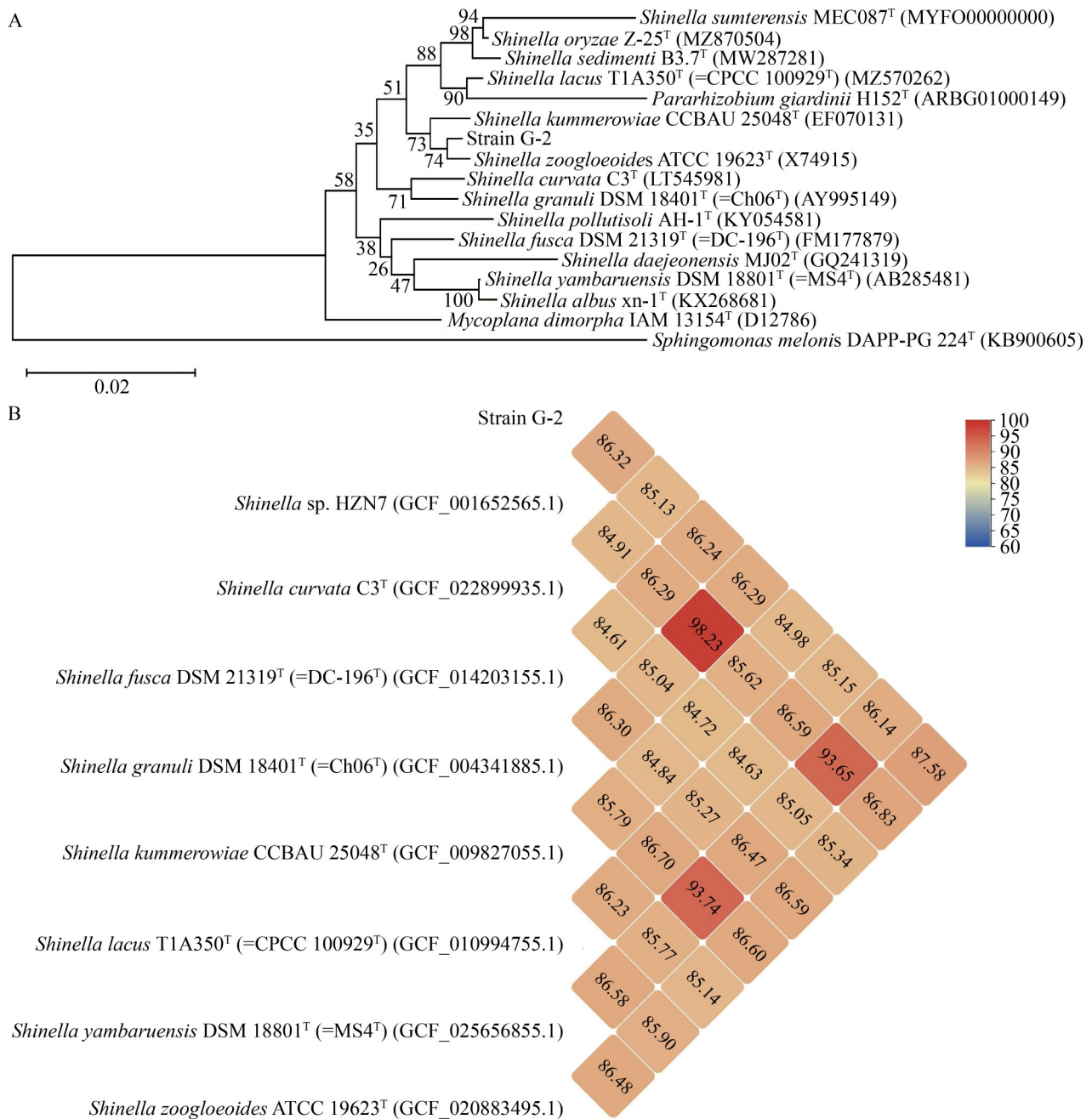


图1 菌株G-2的分子生物学鉴定。A: 菌株G-2的16S rRNA基因序列系统发育树(菌株后面括号内为其16S rRNA基因序列的GenBank登录号; 分支处的数值是bootstrap值; 标尺表示每位点0.02个核苷酸替换); B: 菌株G-2的ANI值分析(菌株后面括号内为其基因组序列的GenBank登录号)。

Figure 1 Molecular biological identification of strain G-2. A: Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of strain G-2 and other related strains (The NCBI accession number for the 16S rRNA gene sequence of each strain is given in parentheses after the strain name; The value at the branch is the bootstrap value; scale bar represents 0.02 nucleotide substitutions per site); B: ANI analysis of strain G-2 (The NCBI accession number for the genome sequence of each strain is given in parentheses after the strain name).

表2 *Shinella* sp. G-2与8株申氏菌属(*Shinella*)菌株的dDDH值Table 2 The dDDH values between strain G-2 and eight strains of the *Shinella* genus

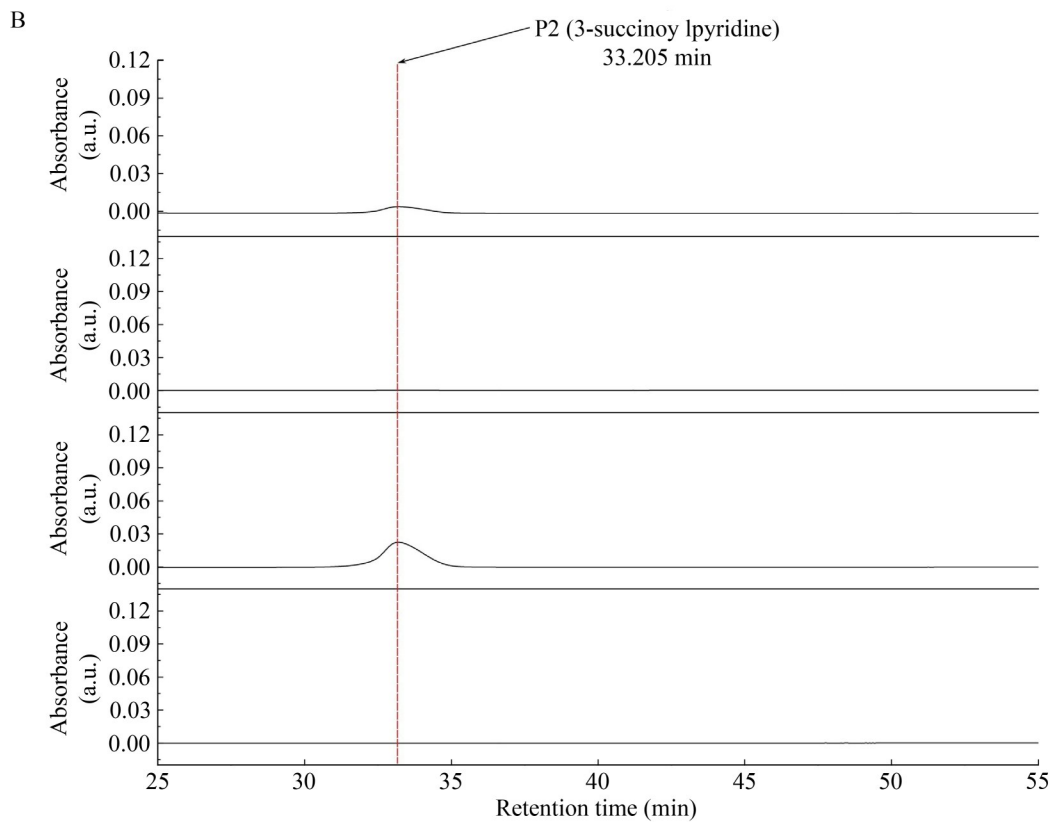
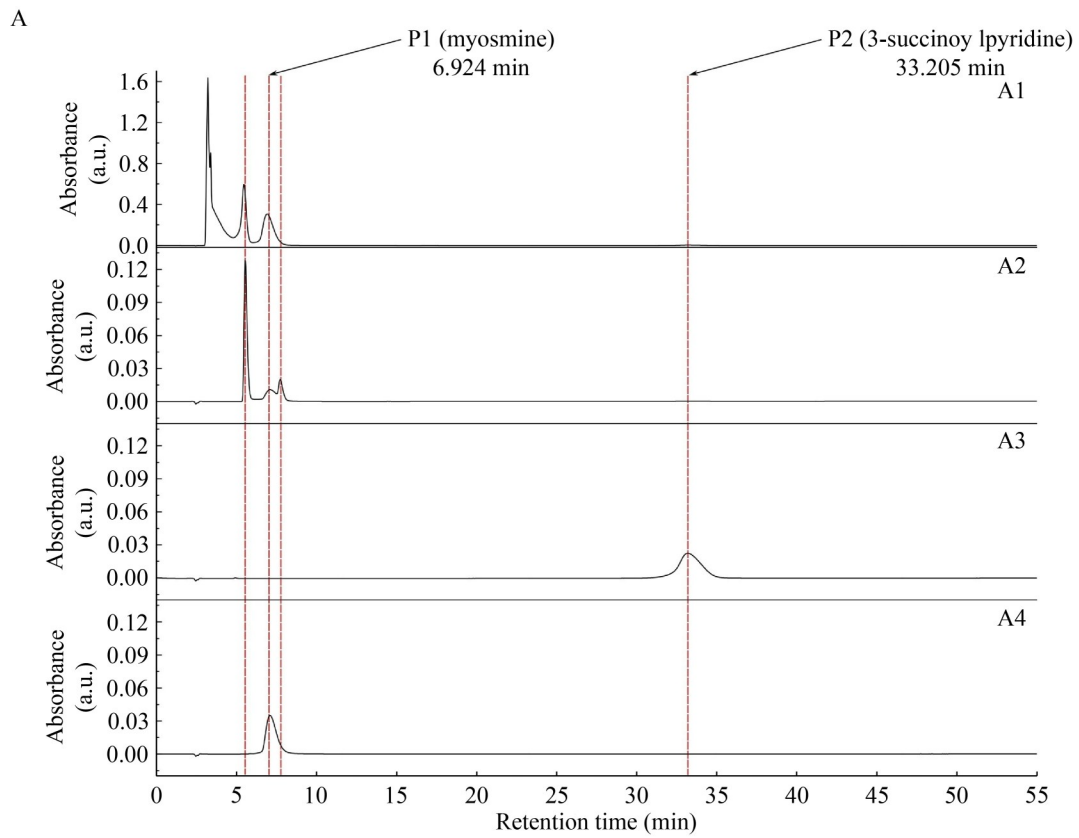
Strain name	Accession number	dDDH value (%)
<i>Shinella</i> sp. HZN7	GCF_001652565.1	31.5
<i>Shinella granulii</i> DSM 18401 <sup>T</sup> (=Ch06 <sup>T</sup> )	GCF_004341885.1	31.4
<i>Shinella kummerowiae</i> CCBau 25048 <sup>T</sup>	GCF_009827055.1	29.3
<i>Shinella lacus</i> T1A350 <sup>T</sup> (=CPC 100929 <sup>T</sup> )	GCF_010994755.1	29.6
<i>Shinella fusca</i> DSM 21319 <sup>T</sup> (=DC-196 <sup>T</sup> )	GCF_014203155.1	31.3
<i>Shinella zoogloeoides</i> ATCC 19623 <sup>T</sup>	GCF_020883495.1	33.8
<i>Shinella curvata</i> C3 <sup>T</sup>	GCF_022899935.1	29.5
<i>Shinella yambaruensis</i> DSM 18801 <sup>T</sup> (=MS4 <sup>T</sup> )	GCF_025656855.1	31.5

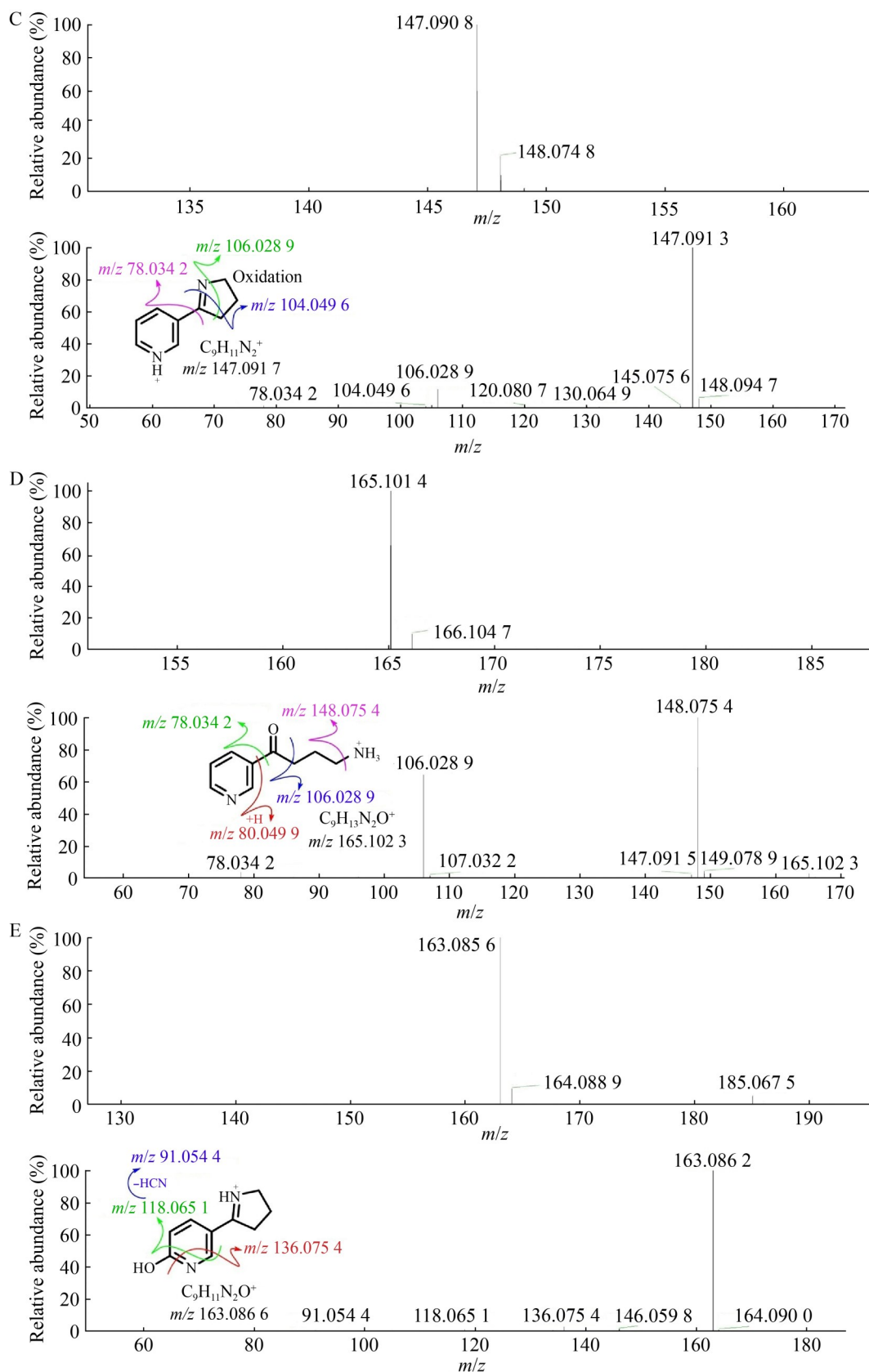
珀酰吡啶(图 2F)。化合物 D 在正离子模式下所得的质子化分子离子峰为  $m/z$  165.101 4  $[M+H]^+$ , 确定其分子式为  $C_9H_{12}N_2O$ 。在其二级质谱图中观察到碎片离子峰  $m/z$  148.075 4、 $m/z$  106.028 9、 $m/z$  80.049 9 和  $m/z$  78.034 2, 鉴定化合物 D 为假氧化去甲烟碱(图 2D)。化合物 E 在正离子模式下所得的质子化分子离子峰为  $m/z$  163.085 6  $[M+H]^+$ , 确定其分子式为  $C_9H_{10}N_2O$ 。在其二级质谱图中观察到碎片离子峰  $m/z$  136.075 4、 $m/z$  118.065 1 和  $m/z$  91.054 4, 鉴定化合物 E 为 6-羟基-麦斯明(图 2E)。化合物 G 在正离子模式下所得的质子化分子离子峰为  $m/z$  196.059 6  $[M+H]^+$ , 确定其分子式为  $C_9H_9NO_4$ 。在二级质谱中观察到碎片离子峰  $m/z$  96.044 7、 $m/z$  122.023 7、 $m/z$  150.054 7 和  $m/z$  178.049 5, 鉴定化合物 G 为 6-羟基-3-琥珀酰吡啶(图 2G)。化合物 H 在正离子模式下所得的质子化分子离子峰为  $m/z$  112.039 0  $[M+H]^+$ , 确定其分子式为  $C_5H_5NO_2$ 。在二级质谱中观察到碎片离子峰为  $m/z$  84.044 7、 $m/z$  94.029 0, 鉴定化合物 H 为 2,5-二羟基吡啶(图 2H)。

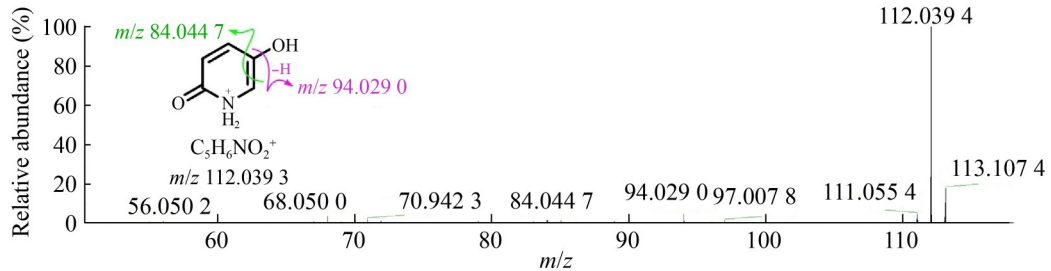
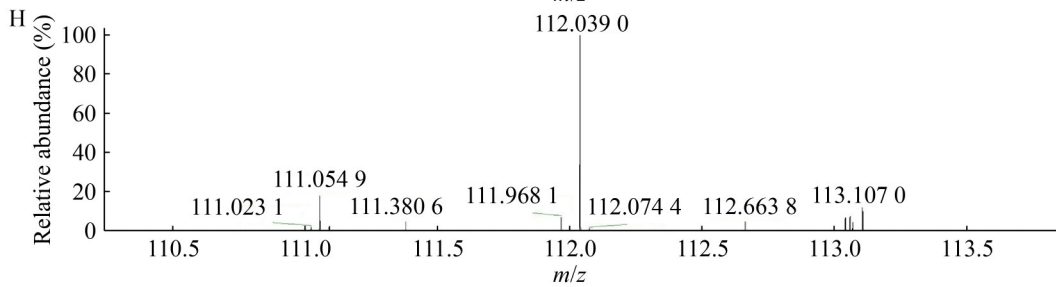
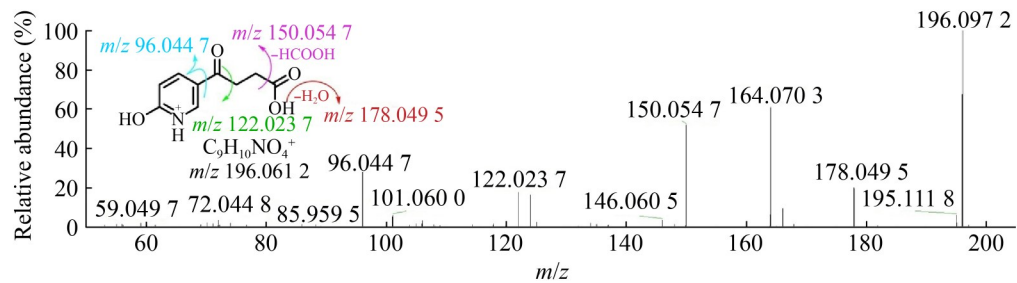
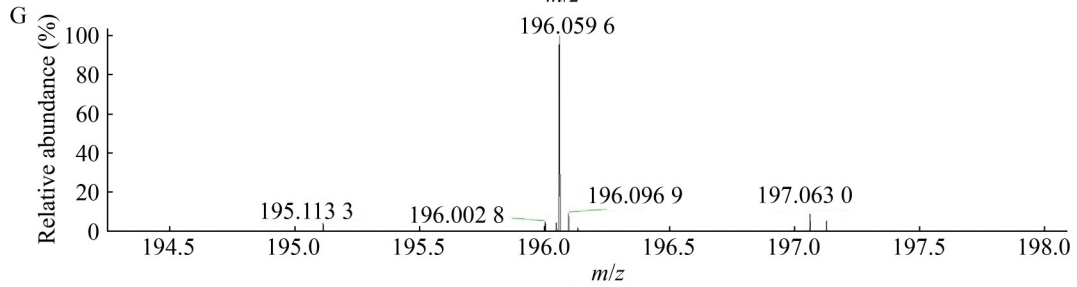
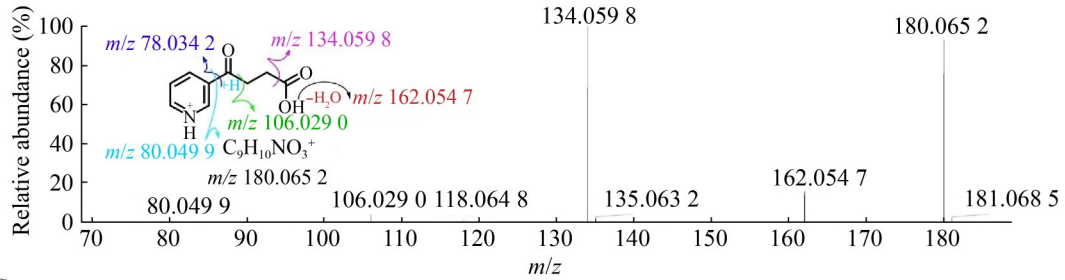
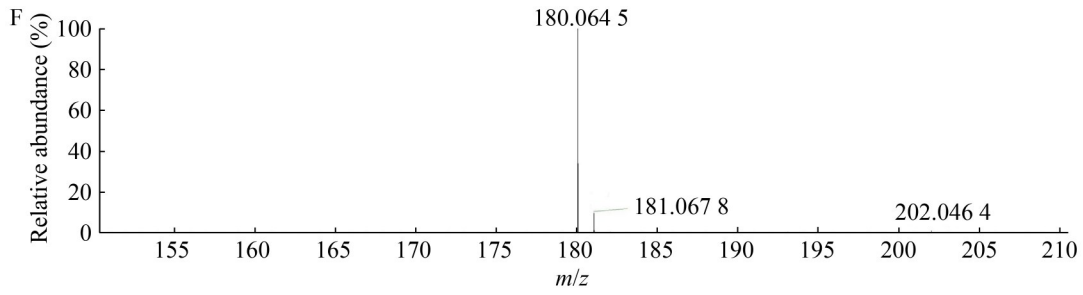
## 2.4 *Shinella* sp. G-2 烟碱降解基因预测

麦斯明作为烟碱的结构类似物, 在降解

过程中可能与烟碱利用相同的酶类。本研究利用 BLAST 工具将菌株 G-2 的编码蛋白序列与吡啶途径、吡咯烷途径和 VPP 途径的代表菌株中已鉴定的烟碱降解相关酶类进行比对分析。结果显示, 菌株 G-2 基因组中存在与 VPP 途径所有关键降解酶类相对应的同源基因, 包括烟碱脱氢酶 (nicotine dehydrogenase, NdhAB)、6-羟基烟碱氧化酶 (6-hydroxynicotine oxidase, Hno)、6-羟基假氧化烟碱氧化酶 (6-hydroxypseudoxy nicotine oxidase, Pno)、醛脱氢酶 (6-hydroxy-3-succinoylsemialdehyde-pyridine dehydrogenase, Ald)、6-羟基-3-琥珀酰吡啶羟化酶 (6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine hydroxylase, Hsh)、2,5-二羟基吡啶双加氧酶 (2,5-dihydroxypyridine dioxygenase, Hpo)、*N*-甲酰马来酰胺酸脱甲酰基酶 (*N*-formylmaleamate deformylase, Nfo)、马来酰胺酸水解酶 (maleamate amidase, Ami)、马来酸顺反异构酶 (maleate isomerase, Iso)。进一步分析显示, 这些同源基因以基因簇形式存在, 其基因排列顺序与根瘤农杆菌 (*A. tumefaciens*) S33 和申氏菌 (*Shinella* sp.) HZN7 的 VPP 途径基因簇相似(图 3)。







**图2 菌株G-2降解麦斯明的代谢产物鉴定。**A: 菌株G-2麦斯明降解产物样品的HPLC分析(A1: 降解产物样品的HPLC色谱图; A2: 稀释25倍后的降解产物样品HPLC色谱图; A3: 3-琥珀酰吡啶标准品的HPLC色谱图; A4: 麦斯明标准品的HPLC色谱图); B: 图A的局部放大HPLC色谱图(25–55 min); C–H: 菌株G-2降解麦斯明代谢产物的一级质谱图和二级质谱图, 其中C为麦斯明, D为假氧化去甲烟碱, E为6-羟基-麦斯明, F为3-琥珀酰吡啶, G为6-羟基-3-琥珀酰吡啶, H为2,5-二羟基吡啶。

Figure 2 Identification of myosmine degradation metabolites by strain G-2. A: HPLC analysis of the myosmine degradation products by strain G-2 (A1: HPLC chromatogram of the myosmine degradation sample; A2: HPLC chromatogram of the 25-fold diluted sample; A3: HPLC chromatogram of authentic standard 3-succinoylpyridine; A4: HPLC chromatogram of authentic standard myosmine); B: Enlarged view of the HPLC chromatogram of Figure A (25 – 55 min); C – H: The primary and secondary mass spectra of the myosmine degradation products by strain G-2, where C represents myosmine, D represents pseudooxy-nornicotine, E represents 6-hydroxy-myosmine, F represents 3-succinoyl-pyridine, G represents 6-hydroxy-3-succinoylpyridine, H represents 2,5-dihydroxypyridine.

### 3 讨论

申氏菌属(*Shinella*)是假单胞菌门 $\alpha$ -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)根瘤菌目(*Rhizobiales*)根瘤菌科(*Rhizobiaceae*)中的一类革兰氏阴性菌。该属菌株具有降解多种污染物的能力, 包括多环芳烃、酰胺类除草剂、霉菌毒素、双酚A及烟碱等。例如, 申氏菌(*Shinella* sp.) FLN 14能够有效降解菲、二氢茈和茈萸等多种多环芳烃类化合物, 可用于多环芳烃污染环境的生物修复<sup>[45]</sup>; 菌株申氏菌(*Shinella* sp.) Y-4能够有效降解酰胺类除草剂乙草胺, 对丙草胺和丁草胺等农药也有良好的降解效果<sup>[46]</sup>; *S. oryzae* Z-25能够降解危害最严重的霉菌毒素玉米赤霉烯酮<sup>[47]</sup>; 申氏菌(*Shinella* sp.) HZB1能以双酚A为唯一碳源和能源生长, 有效降解双酚A<sup>[48]</sup>; 申氏菌(*Shinella* sp.) HZN7则被报道具有降解烟碱的能力。本研究分离出的*Shinella* sp. G-2菌株具有降解麦斯明的能力, 这是首次发现具有降解麦斯明能力的申氏菌属(*Shinella*)菌株。鉴于申氏菌属(*Shinella*)菌株既能降解烟碱, 也能降解其结构类似物麦斯明, 可以推测烟碱和麦斯明在申氏菌属(*Shinella*)中的降解机制可能存在相似性。

本研究通过对已知的烟碱降解相关酶类进

行系统比对分析, 在菌株G-2中鉴定出一个VPP途径基因簇。基于这一发现, 并结合对菌株G-2降解麦斯明过程中产生的代谢产物的鉴定结果, 我们推测了菌株G-2的麦斯明降解途径。由于麦斯明和烟碱为结构类似物, 推测菌株G-2可能利用VPP途径中的酶类通过类似于VPP途径的代谢途径来实现对麦斯明的降解。推测的降解途径如下: (1) 麦斯明的吡啶环发生羟基化反应生成6-羟基-麦斯明; (2) 6-羟基-麦斯明自发水解生成6-hydroxy-pseudooxy-nornicotine; (3) 6-hydroxy-pseudooxy-nornicotine被氧化为6-羟基-3-琥珀酰半醛吡啶(6-hydroxy-3-succinoylsemialdehyde-pyridine), 后者进一步被转化为6-羟基-3-琥珀酰吡啶; (4) 6-羟基-3-琥珀酰吡啶进一步转化为2,5-二羟基吡啶, 2,5-二羟基吡啶通过一系列反应转化为富马酸(fumaric acid); (5) 富马酸进入三羧酸循环, 完成降解过程(图4)。然而, 在本研究中, 除了推测途径中出现的6-羟基-3-琥珀酰吡啶、6-羟基-麦斯明、假氧化去甲烟碱和2,5-二羟基吡啶4种化学物质外, 还检测到3-琥珀酰吡啶的存在, 而3-琥珀酰吡啶是烟碱代谢的吡咯烷途径中的中间产物, 但是菌株G-2并不含吡咯烷途径基因簇。因此,



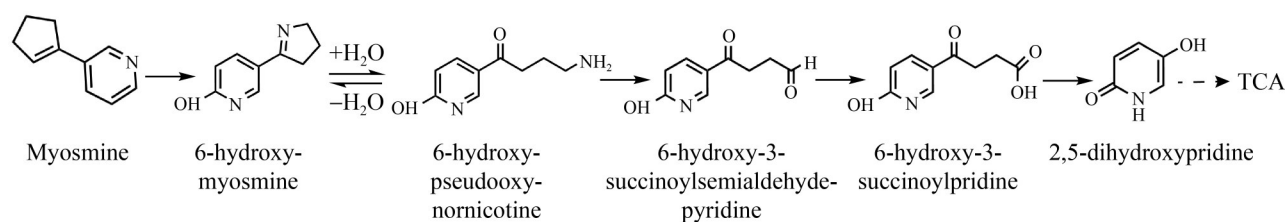


图4 菌株G-2降解麦斯明的代谢途径推断

Figure 4 The proposed myosmine degradation pathway by strain G-2.

菌株 G-2 中 3-琥珀酰吡啶的生成机制仍需进一步深入研究。

目前, 关于麦斯明微生物降解的研究相对较少。已知的麦斯明降解菌株包括分枝菌酸小杆菌(*Mycolicibacterium* sp.) SMGY-1XX 和鞘氨醇盒菌(*Sphingopyxis* sp.) J-6。菌株 SMGY-1XX 通过吡啶途径降解麦斯明。菌株 J-6 对麦斯明的代谢较为复杂, 涉及多种途径, 包括经由 VPP 途径的降解。特别值得注意的是, 菌株 J-6 存在一条此前未在微生物中报道过的烟草生物碱代谢途径, 其独特之处在于麦斯明被转化为 3-琥珀酰吡啶, 并最终代谢为 3-吡啶乙酸。在本研究中, 菌株 G-2 的降解途径与菌株 SMGY-1XX 不同, 而与菌株 J-6 的 VPP 途径相似。

菌株 G-2、申氏菌(*Shinella* sp.) HZN7 以及根瘤农杆菌(*A. tumefaciens*) S33 三者的 VPP 途径基因簇显示出高度的保守性。这三者的 VPP 途径基因簇的基因排列顺序一致, 并且烟碱降解相关基因核酸序列相似度很高。它们之间的区别主要体现在转座酶编码基因上。在这 3 个菌株中, 菌株 G-2 与申氏菌(*Shinella* sp.) HZN7 的 VPP 途径基因簇基本相同, 但在申氏菌(*Shinella* sp.) HZN7 中, *paz* 基因被转座酶编码基因所分割, 而菌株 G-2 与根瘤农杆菌(*A. tumefaciens*) S33 的 *paz* 基因则保持完整。菌株 G-2 和申氏菌(*Shinella* sp.) HZN7 的 ANI 值为 86.32%, dDDH 值为 31.5%, 均远低于各自的物种分类的阈值, 因此 2 株菌明确为 *Shinella* 属的不同物种。申氏

菌属(*Shinella*)和农杆菌属(*Agrobacterium*)同属根瘤菌科。这些信息表明, 这 3 个菌的 VPP 途径基因簇可能具有共同的起源, 该基因簇在根瘤菌科的申氏菌属(*Shinella*)和农杆菌属(*Agrobacterium*)之间, 以及申氏菌属(*Shinella*)不同种之间发生了迁移。

## 4 结论

本研究成功从植烟土壤中筛选出一株具有麦斯明降解能力的菌株 G-2。通过形态学观察、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列比对、基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析、ANI 分析和 dDDH 分析确定菌株 G-2 隶属于申氏菌属(*Shinella*), 并将其命名为 *Shinella* sp. G-2。基因组分析表明, *Shinella* sp. G-2 基因组中存在与 VPP 途径所有关键降解酶类相对应的同源基因, 含有一个 VPP 途径基因簇的同源基因簇。HPLC 分析和 UHPLC-MS/MS 分析鉴定出菌株 G-2 降解麦斯明的 5 种代谢产物, 分别是假氧化去甲烟碱、6-羟基-麦斯明、6-羟基-3-琥珀酰吡啶、2,5-二羟基吡啶和 3-琥珀酰吡啶。根据基因组分析和代谢产物鉴定的结果, 推测菌株 G-2 可能利用 VPP 途径中的酶类, 通过类似于 VPP 途径的代谢途径对麦斯明进行降解。

## 作者贡献声明

高辉: 实验设计、操作及论文撰写及修改;  
喻梦梦: 协助实验操作、论文讨论; 张入匀:

协助实验操作; 贾玮: 提供资源; 张希: 项目管理; 付博: 项目管理、提供资源; 许自成: 提供资源; 郭志刚: 项目管理、论文审阅; 党炳俊: 提出概念、实验设计、实验指导、文章指导及修改润色、项目管理、提供资源。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 王瑞新, 齐群纲, 韩锦峰. 烟草生物碱的生物合成与代谢[J]. 河南农业大学学报, 1988, 22(1): 65-77.  
WANG RX, QI QG, HAN JF. Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids[J]. Journal of Henan Agricultural University, 1988, 22(1): 65-77 (in Chinese).
- [2] 李宗平, 覃光炯, 陈茂胜, 张俊杰, 彭灏, 吴哲宽, 杨丽萍. 不同调制方法对烟草烟碱转化及TSNA的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(10): 1268-1276.  
LI ZP, QIN GJ, CHEN MS, ZHANG JJ, PENG H, WU ZK, YANG LP. Effects of curing methods on conversion rate of nicotine and TSNA contents of tobacco[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2015, 23(10): 1268-1276 (in Chinese).
- [3] 孙雨琦, 张蓝月, 刘德水, 秦艳青, 赵园园, 王俊, 张瑞娜, 马雁军, 李晶晶, 周骏, 史宏志. 四川雪茄烟叶在成熟与晾晒和发酵过程中烟草特有亚硝胺的积累动态[J]. 烟草科技, 2022, 55(5): 25-31.  
SUN YQ, ZHANG LY, LIU DS, QIN YQ, ZHAO YY, WANG J, ZHANG RN, MA YJ, LI JJ, ZHOU J, SHI HZ. Dynamic accumulation of TSNA in Sichuan cigar tobacco during mature, air-curing and fermentation[J]. Tobacco Science & Technology, 2022, 55(5): 25-31 (in Chinese).
- [4] 丁睿. 我国主要晒红烟产区烟叶烟草特有亚硝胺(TSNA)的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.  
DING R. Study on TSNA of red Sun-cured tobacco from main[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014 (in Chinese).
- [5] 刘国顺, 赵春华, 崔树毅, 杨天旭. 烟草特有亚硝胺及其前体物研究进展[J]. 中国烟草学报, 2007, 13(1): 44-47.  
LIU GS, ZHAO CH, CUI SY, YANG TX. Recent advances in research of TSNA and their precursors[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2007, 13(1): 44-47 (in Chinese).
- [6] 周迪, 孙雨琦, 史宏志, 杨兴有, 周骏, 鲁喜梅, 白若石, 阳苇丽, 赵园园, 秦艳青. 16个雪茄烟品种的烟碱转化率及与发酵后烟叶TSNA含量的关系[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(4): 18-25.  
ZHOU D, SUN YQ, SHI HZ, YANG XY, ZHOU J, LU XM, BAI RS, YANG WL, ZHAO YY, QIN YQ. Nicotine conversion rate of 16 cigar varieties and its relationship with TSNA content in fermented tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2020, 26(4): 18-25 (in Chinese).
- [7] 雷凯春, 岳红梅. 吸烟对慢性阻塞性肺病患者肺功能的影响[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2021, 27(3): 294-297.  
LEI KC, YUE HM. Effect of smoking on pulmonary function in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Treatment, 2021, 27(3): 294-297 (in Chinese).
- [8] HECHT SS, CARMELLA SG, YE M, LE KA, JENSEN JA, ZIMMERMAN CL, HATSUKAMI DK. Quantitation of metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone after cessation of smokeless tobacco use[J]. Cancer Research, 2002, 62(1): 129-134.
- [9] HECHT SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines[J]. Chemical Research in Toxicology, 1998, 11(6): 559-603.
- [10] HOFFMANN D, BRUNNEMANN KD, PROKOPCZYK B, DJORDJEVIC MV. Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1994, 41(1): 1-52.
- [11] WIERNIK A, CHRISTAKOPOULOS A, JOHANSSON L, WAHLBERG I. Effect of air-curing on the chemical composition of tobacco[J]. Recent Advances in Tobacco Science, 1955, 21: 39-80.
- [12] 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).
- [13] SAITOH F, NOMA M, KAWASHIMA N. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species[J]. Phytochemistry, 1985, 24(3): 477-480.
- [14] 史宏志, Bush LP, Krauss M. 烟碱向降烟碱转化对烟叶麦斯明和TSNA含量的影响[J]. 烟草科技, 2004, 37(10): 27-30.  
SHI HZ, BUSH LP, KRAUSS M. Effect of nicotine to nornicotine conversion on myosmine and TSNA contents in burley tobacco[J]. Tobacco Science & Technology, 2004, 37(10): 27-30 (in Chinese).
- [15] ZWICKENPFLUG W. *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosornicotine)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2): 392-394.
- [16] WILP J, ZWICKENPFLUG W, RICHTER E. Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(8): 1223-1228.
- [17] VOGT S, FUCHS K, RICHTER E. Genotoxic effects of myosmine in a human esophageal adenocarcinoma cell line[J]. Toxicology, 2006, 222(1/2): 71-79.
- [18] TYROLLER S, ZWICKENPFLUG W, RICHTER E.

- New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables, and milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(17): 4909-4915.
- [19] WADA E. Microbial degradation of the tobacco alkaloids, and some related compounds[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1957, 72(1): 145-162.
- [20] 孙蒙蒙. 一株烟碱降解菌的分离鉴定及其降解代谢的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- SUN MM. Isolation, identification and degradation of a nicotine-degrading strain[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [21] 邓帅军. 古引四号雪茄烟叶主要苦味物质的鉴定与微生物降解研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2022.
- DENG SJ. Identification and microbial degradation of the main bitter substances in GuYin number four cigar tobacco leaves[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022 (in Chinese).
- [22] 张豪洋. 烟碱降解细菌根癌农杆菌LN-1 (*Agrobacterium tumefaciens* LN-1)的筛选、鉴定及其降解特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- ZHANG HY. Study on the screening, identification and degradation characteristics of the nicotine-degrading bacteria *Agrobacterium tumefaciens* LN-1[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [23] GONG XW, YANG JK, DUAN YQ, DONG JY, ZHE W, WANG L, LI QH, ZHANG KQ. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(3): 200-204.
- [24] GANAS P, SACHELARU P, MIHASAN M, IGLOI GL, BRANDSCH R. Two closely related pathways of nicotine catabolism in *Arthrobacter nicotinovorans* and *Nocardioides* sp. strain JS614[J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 189(5): 511-517.
- [25] MA GH. Diversity and phylogenetic analyses of nicotine-degrading bacteria isolated from tobacco plantation soils[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(34): 6392-6398.
- [26] BRANDSCH R. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(5): 493-498.
- [27] TANG HZ, WANG LJ, WANG WW, YU H, ZHANG KZ, YAO YX, XU P. Systematic unraveling of the unsolved pathway of nicotine degradation in *Pseudomonas*[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(10): e1003923.
- [28] TANG HZ, WANG SN, MA LY, MENG XZ, DENG ZX, ZHANG DK, MA CQ, XU P. A novel gene, encoding 6-hydroxy-3-succinoylpyridine hydroxylase, involved in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1567-1574.
- [29] 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.
- [30] YU H, TANG HZ, LI YY, XU P. Molybdenum-containing nicotine hydroxylase genes in a nicotine degradation pathway that is a variant of the pyridine and pyrrolidine pathways[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(24): 8330-8338.
- [31] 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.
- [32] WANG MZ, YANG GQ, MIN H, LV 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.
- [33] 李雪梅, 杨金奎, 张克勤, 杨伟租, 陈春梅. 一种用微生物制备的粗酶液及其应用: CN115247207B[P]. 2010-04-14.
- [34] WANG WW, XU P, TANG HZ. Sustainable production of valuable compound 3-succinoyl-pyridine by genetically engineering *Pseudomonas putida* using the tobacco waste[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16411.
- [35] QIU JG, LI N, LU ZM, YANG YJ, MA Y, NIU LL, HE J, LIU WP. Conversion of normicotine to 6-hydroxy-nornicotine and 6-hydroxy-myosmine by *Shinella* sp. strain HZN7[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23): 10019-10029.
- [36] NAJME R, ZHUANG SL, QIU JG, LU ZM. Identification and characterization of normicotine degrading strain *Arthrobacter* sp. NOR5[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 764: 142894.
- [37] DANG BJ, JIA W, MA SL, ZHANG XP, HUANG Y, HUANG WX, HAN D, ZHANG K, ZHAO FC, ZHANG YW, XU ZC. Characterization of a novel normicotine-degrading strain *Mycolicibacterium* sp. SMGY-1XX from a normicotine-degrading consortium and preliminary elucidation of its biodegradation pathway by multi-omics analysis[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 457: 131777.
- [38] DANG BJ, GAO H, JIA W, ZHANG YW, XU ZC, HAN D, YANG JC, HUANG Y, CHEN Z, WANG YD, DUAN YQ, YUAN RH, QIAO YM, YU HX, JIN PF, AI HT, HUANG WX. Degradation of myosmine by a novel bacterial strain *Sphingopyxis* sp. J-6 and its degradation pathways[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2025, 486: 136996.
- [39] 张雨薇, 唐培培, 刘子琦, 李翔, 吴俊林, 苗森, 路鹏, 贾玮, 郝浩浩, 党炳俊. 一株抑制烟草疫霉的耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)的分离、鉴定及全基因组测序分析[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(4): 1760-1774.
- ZHANG YW, TANG PP, LIU ZQ, LI X, WU JL, MIAO S, LU P, JIA W, HAO HH, DANG BJ. Isolation, identification, and whole genome sequencing of a *Bacillus halotolerans* strain inhibiting *Phytophthora nicotianae*[J]. *Microbiology China*, 2025, 52(4): 1760-1774 (in Chinese).

- [40] QIU JG, MA Y, CHEN LS, WU LF, WEN YZ, LIU WP. A *sirA*-like gene, *sirA2*, is essential for 3-succinoyl-pyridine metabolism in the newly isolated nicotine-degrading *Pseudomonas* sp. HZN6 strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(5): 1023-1032.
- [41] LEE I, OUK KIM Y, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [42] CHEN G, HE M, LI KJ, ZHENG KW, TANG XX, DEBNATH SC, WANG PM, GUO Z, HONG Y, ZHENG DQ. *Shinella sedimenti* sp. nov., isolated from sediment of Zhairuo Island located in the East China Sea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(8): 006000.
- [43] CHUN J, RAINEY FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the bacteria and archaea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 316-324.
- [44] SCHLEIFER KH. Classification of bacteria and archaea: past, present and future[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(8): 533-542.
- [45] WANG Z, HU HY, ZHANG Z, XU YM, XU P, TANG HZ. 1A multiple PAHs-degrading *Shinella* sp. strain and its potential bioremediation in wastewater[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 879: 162974.
- [46] 倪俊, 沈维亮, 闫新, 李顺鹏. 乙草胺降解菌 Y-4 的分离鉴定及降解特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(5): 946-951.
- NI J, SHEN WL, YAN X, LI SP. Isolation and characterization of a acetochlor-degrading strain Y-4 and its degrading characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(5): 946-951 (in Chinese).
- [47] 高如雨. 玉米赤霉烯酮降解酶的筛选鉴定与异源表达[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- GAO RY. Screening identification and heterologous expression of zearalenone-degrading enzymes[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [48] 马云, 刘学虎, 洪骏. 双酚 A 降解菌的分离鉴定和降解特性研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2014, 42(2): 162-166.
- MA Y, LIU XH, HONG J. Isolation and characterization of a bacterium degrading bisphenol A[J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2014, 42(2): 162-166 (in Chinese).