

产脲节杆菌 Pu17 通过吡啶途径降解烟碱解析

黄应群¹, 李昂², 李佳颖¹, 骆君华¹, 金锦杭¹, 袁春辉¹, 许小霞²,
金丰良^{2*}

1 湖南省烟草公司永州市公司, 湖南 永州

2 华南农业大学 植物保护学院, 绿色农药全国重点实验室, 广东 广州

黄应群, 李昂, 李佳颖, 骆君华, 金锦杭, 袁春辉, 许小霞, 金丰良. 产脲节杆菌 Pu17 通过吡啶途径降解烟碱解析[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2462-2480.

HUANG Yingqun, LI Ang, LI Jiaying, LUO Junhua, JIN Jinhang, YUAN Chunhui, XU Xiaoxia, JIN Fengliang. Elucidation of nicotine via the pyridine pathway by *Paenarthrobacter ureafaciens* Pu17[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2462-2480.

摘要: 【目的】针对上部烟叶烟碱含量过高所引发的生产和环境问题, 以前期筛选获得的高效烟碱降解菌 Pu17 为研究对象, 利用基因组学方法系统解析其降解烟碱的分子机制。【方法】采用平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析确定其分类地位; 通过全基因组测序与注释阐明烟碱代谢通路; 利用 MS/MS 技术检测降解过程中的关键中间产物; 通过活体试验探究降解烟碱的最佳施用方法。【结果】系统发育分析表明, Pu17 与产脲节杆菌(*Paenarthrobacter ureafaciens*)的 ANI 值为 96.51%, 鉴定 Pu17 为产脲节杆菌。其基因组大小为 4.47 Mb, G+C 含量为 63.34%, 编码 4 155 个蛋白。功能注释与比较基因组学分析发现, Pu17 在重金属抗性、细胞表面合成及代谢潜能方面具有独特的基因簇, 构成了其环境适应性策略。代谢产物分析检测到 6-羟基假氧尼古丁等关键中间体, 结合基因组分析证实 Pu17 通过吡啶途径降解烟碱, 其关键基因(如 *nboR*、*mao*、*6-hlno* 等)主要位于质粒上。降解效能评估显示, Pu17 发酵液在烟草植株(叶面喷施与根灌)应用中均能有效降低烟碱含量, 活体烟叶中最大降解率达 14.00%。【结论】本研究从基因组学、代谢组学及应用层面系统阐明了 *P. ureafaciens* Pu17 降解烟碱的分子机制与应用潜力, 为基于微生物的烟草废弃物修复及降害技术开发提供了理论依据和菌种资源。

关键词: 烟碱; MS/MS; Pu17 菌株; 全基因组分析

资助项目: 湖南省烟草公司永州市公司科技项目(YZ2021KJ11)

This work was supported by the Science and Technology Project of Yongzhou Branch of Hunan Tobacco Company (YZ2021KJ11).

*Corresponding author. E-mail: jflbang@scau.edu.cn

Received: 2025-12-05; Accepted: 2026-01-15; Published online: 2026-02-14

Elucidation of nicotine *via* the pyridine pathway by *Paenarthrobacter ureafaciens* Pu17

HUANG Yingqun¹, LI Ang², LI Jiaying¹, LUO Junhua¹, JIN Jinhang¹, YUAN Chunhui¹, XU Xiaoxia², JIN Fengliang^{2*}

1 Hunan Tobacco Company Yongzhou Company, Yongzhou, Hunan, China

2 State Key Laboratory of Green Pesticide, College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: **[Objective]** In view of the production and environmental issues caused by excessively high nicotine content in upper tobacco leaves, this study aims to decipher the molecular mechanism of nicotine degradation by an efficient nicotine-degrading strain Pu17 screened out in the previous study *via* genomic approaches. **[Methods]** The taxonomic status of the strain was determined by average nucleotide identity (ANI) analysis. Whole genome sequencing and annotation were employed to clarify the nicotine metabolic pathway. Key intermediates during degradation were detected by MS/MS. Live plant trials were conducted to explore the optimal application method for nicotine reduction. **[Results]** Phylogenetic analysis revealed an ANI value of 96.51% between Pu17 and *Paenarthrobacter ureafaciens*, identifying Pu17 as a strain of *P. ureafaciens*. The genome of Pu17 was 4.47 Mb in length, with the G+C content of 63.34%, encoding 4 155 proteins. Functional annotation and comparative genomics identified unique gene clusters related to heavy metal resistance, cell surface synthesis, and metabolic potential in Pu17, which constituted its environmental adaptation strategy. Metabolite analysis detected key intermediates such as 6-hydroxypseudooxynicotine. This result, combined with that of genomic analysis, confirmed that Pu17 degraded nicotine *via* the pyridine pathway, with key genes (e.g., *nboR*, *mao*, and *6-hlno*) primarily located on plasmids. Efficacy evaluation demonstrated that the Pu17 fermentation broth effectively reduced nicotine content in tobacco plants through both foliar spraying and root irrigation, achieving a maximum degradation rate of 14.00% in live leaves. **[Conclusion]** This study systematically elucidates the molecular mechanism and application potential of *P. ureafaciens* Pu17 for nicotine degradation from genomic, metabolomic, and application perspectives. It provides a theoretical basis and microbial resources for the development of bioremediation technologies for tobacco waste and harm reduction.

Keywords: nicotine; MS/MS; strain Pu17; whole genome analysis

烟草是我国重要的经济作物, 其所含的尼古丁(烟碱)通常占烟草总生物碱含量的 95% 左右^[1]。尼古丁由一个氢化吡咯烷环和一个吡啶环构成, 近年来由于烟草种植中氮肥施用过量, 导致烟叶中尼古丁积累过多, 在某些情况下可

达烟叶干重的 6%, 严重影响其吸食品质^[2]。研究表明, 烟叶中淀粉与尼古丁含量过高、还原糖含量偏低, 易导致烟气粗糙、刺激性强、香气不足及口感不协调等问题。其中, 尼古丁含量过高已成为制约我国烟叶品质提升的关键因

素之一^[3]。此外, 卷烟加工过程中产生的烟草废弃物中也含有大量尼古丁。种植与加工环节残留的尼古丁可能通过雨水淋溶进入地下水, 造成环境污染。更值得关注的是, 尼古丁可穿透生物膜及血脑屏障, 对人体组织与细胞产生毒性效应^[4]。因此, 欧盟早在 1999 年已将烟草废弃物列为有毒有害废弃物^[5]。目前常用的尼古丁削减技术主要包括农业调控、物理化学处理及微生物降解 3 类。然而, 农业手段存在育种周期长、操作复杂等局限; 物理化学方法则成本较高, 且可能带来二次污染。相比之下, 微生物降解尼古丁具有效率高、环境友好等优势, 被认为是降低烟叶和环境介质中尼古丁含量的潜在有效途径^[6-7]。

微生物作为自然界的重要分解者, 代谢方式多样、繁殖迅速, 在土壤生态修复、质量改良及尼古丁降解等方面展现出高效、低污染和可持续的应用潜力^[8-9]。目前已报道的尼古丁降解微生物主要通过吡咯途径、吡啶途径及吡咯-吡啶途径进行代谢, 常见菌属包括假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)、农杆菌属(*Agrobacterium* sp.)、申氏菌属(*Shinella* sp.)及苍白杆菌属(*Ochrotrichum* sp.)等^[2,10-12]。

然而, 国内关于节杆菌属降解尼古丁的研究相对有限, 现有报道多集中于菌株对离体尼古丁或烟叶中尼古丁的降解效果, 对其分子机制与代谢途径的系统阐述仍较为缺乏。目前研究多集中于微生物直接处理烟叶, 尚未系统探讨施用方式及烟草生长时期对降解效果的影响。已有研究显示, 在适宜条件下节杆菌对尼古丁具有可观的降解潜力: 李旭^[13]报道的节杆菌粗酶在 100 mg/L 尼古丁条件下, 于最适温度 30–40 °C、最适 pH 7.0–8.0 范围内降解率可达 97.6%–96.9%; 邓娜娜等^[14]分离的 *Arthrobacter* sp. AH14 在 120 h 内可完全降解 6 g/L 尼古丁, 对 14 g/L 尼古丁的降解率为 30.22%; 帖金鑫等^[15]通过响应面优化 *Arthrobacter* sp. Z3 降解白肋烟尼古丁的工艺, 在最佳条件下降解率达

31.06%。另据报道, 利用烟草节杆菌 GYC103 发酵处理烟叶 12 h 后, 烟叶中烟碱、淀粉和蛋白质含量分别降低 4.32%、32.50% 和 8.20%, 总糖与还原糖含量则分别增加 13.51% 和 10.02%, 感官品质显著改善^[16]。

本实验室从湖南烟草种植区分离得到一株产脲节杆菌(*Paenarthrobacter ureafaciens*) Pu17^[17]。该菌株具有蛋白酶活性, 最适生长条件为烟碱浓度 2.0 g/L、温度 30 °C、pH 6.0; 生长曲线分析显示, 其在 LB 培养基中延滞期显著短于纯烟碱培养基; Pu17 能以烟碱为唯一碳氮源, 在 48 h 内降解率达 92.75%, 在 LB 培养基中 60 h 降解率为 90.57%^[17]。目前, 基于多组学系统阐述节杆菌降解尼古丁分子机制的研究尚属空白。为此, 本研究综合利用基因组学等方法深入探究 Pu17 降解尼古丁的分子机制, 以期对尼古丁降解的吡啶途径提供新见解, 并为相关微生物资源的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株 Pu17 的全基因组测序与组装

将 Pu17 的单菌落接种于 LB 液体培养基, 于 30 °C、150 r/min 培养至对数生长期, 即 $OD_{600}=0.6-0.8$ 之间。随后, 在 4 °C、10 000×g 离心 5 min 收集菌体。取 1 g 湿菌体样品送至华大基因进行全基因组测序。测序采用从头测序策略: 首先将提取的基因组 DNA 随机片段化, 经电泳筛选并回收目标片段, 连接接头以构建测序文库; 使用建库试剂盒(Oxford Nanopore 公司)完成文库制备。采用 DNBSEQ Platform 和 Nanopore Platform 测序平台, BGISEQ Dat 为 288×, 测序深度为 PE100, reads N50 为 17 134。利用 Canu 软件(v1.5)对所得序列进行基因组从头组装。最后, 使用 gene ontology (GO) (<http://geneontology.org/>)、KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 和 clusters of orthologous genes (COG) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/COG/>)数据库对组

装获得的基因组序列进行通用功能注释。

1.2 平均核苷酸一致性(ANI)分析

基于 16S rRNA 基因序列比对结果, 从 NCBI Assembly 数据库中下载与菌株 Pu17 所在属级分支对应的各参考菌株全基因组序列。采用 OAT 软件(v0.90)计算各参考菌株与 Pu17 之间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)值, 以评估系统发育相关性。在比较基因组学中, ANI 与数字 DNA-DNA 杂交值常共同作为物种划分的关键指标, 通常认为数字化 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)值 $\geq 70\%$ 或 ANI 值 $\geq 95\%$ 的菌株可归为同一物种。本研究的 ANI 分析与 dDDH 分析分别通过 EzBioCloud 在线平台(<https://www.ezbiocloud.net/>)及 GGDC 3.0 网站(<https://ggdc.dsmz.de>)完成。为进一步明确 Pu17 的系统发育地位, 从比对结果中筛选 ANI 值大于 95% 的菌株, 自 NCBI 获取其全基因组序列, 并将 Pu17 与这些近缘种进行单核苷酸水平上的全基因组比对, 以更精确地解析其进化关系与遗传相似性。

1.3 染色体比对分析

从 NCBI 数据库下载 *P. ureafaciens* 及相关种属的菌株全基因组序列。首先, 随机选取包括 *Arthrobacter agilis*、*A. bambusae*、*A. citreus* 等在内的 12 株代表性菌株。采用 BGRI 软件(v0.95)将 Pu17 菌株的染色体 1 与上述菌株的染色体 1 进行全基因组比对。其次, 专门针对 *P. ureafaciens* 种内菌株, 自 NCBI 随机选取包括 *P. ureafaciens* DnL1-1、SD-1、YL1 等在内的 12 株菌株。同样使用 BGRI 软件(v0.95), 对 Pu17 染色体 1 与这些菌株的染色体 1 进行系统比对分析。

1.4 菌株 Pu17 烟碱代谢通路基因簇预测

基于 KEGG 自动注释系统(KEGG automatic annotation server, KAAS)与 BlastKOALA 工具, 对 Pu17 全基因组编码的 4 155 个基因进行功能注释。通过关键词 nicotine degradation、nicotinate

metabolism 及酶编号(EC number)进行初步筛选。利用 KEGG MODULE 数据库中的 M00811 模块(尼古丁降解吡咯烷途径)与 map00760 通路(烟酸与烟酰胺代谢)进行精细匹配与通路重构。

1.5 Pu17 代谢烟碱产物的 MS/MS 分析

为解析菌株 Pu17 对烟碱的代谢过程, 设计了体外降解实验。将对数生长期的 Pu17 种子液按体积分数为 1% 的接种量接入以烟碱为唯一碳氮源(初始浓度 2 g/L)的无机盐培养基, 并设置灭菌培养基作为阴性对照。于 30 °C、150 r/min 条件下培养, 分别在接种后 24 h 和 48 h 取样。样品经 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 滤液于 -20 °C 保存备用。代谢产物采用超高效液相色谱-串联质谱(Agilent 公司)进行分析。色谱分离在 BEH-C18 反相色谱柱上进行, 柱温 35 °C。流动相为甲醇:水(10:90, 体积比), 等度洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长 259 nm。质谱采用正离子模式, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 锥孔电压 3 kV。通过比对实验组与对照组的代谢谱差异, 系统鉴定烟碱降解过程中的中间代谢物。

1.6 Pu17 降解活体烟草烟碱的最适施用方式测定

1.6.1 菌液制备

挑取 Pu17 单菌落接种于 LB 液体培养基, 于 30 °C、150 r/min 培养至 $OD_{600}=0.6-0.8$ 。将发酵液以体积比 1:15 的比例与水混匀, 作为 Pu17 施用液; 将等量 LB 培养基同比例稀释, 作为对照液。

1.6.2 施用频次实验

设计 5 种叶面喷施处理, 以当天 17:00 施用为基准, 分别记为单次喷施(A1, 即 17:00 施用), 以及在此基准时间点之前额外喷施 1 次(A2, 即 14:00 和 17:00 施用)、2 次(A3, 即 11:00、14:00 和 17:00 施用)、3 次(A4, 即 8:00、11:00、14:00 和 17:00 施用)、4 次(A5, 即 5:00、

8:00、11:00、14:00 和 17:00 施用)。每个处理于施用 24 h 后, 采集植株自上而下第 5 片叶, 每组 20 片叶, 试验重复 3 次。

1.6.3 根部灌施效果检测

以每株 400 mL 的剂量, 将 Pu17 施用液浇灌于烟草根部作为处理组, 以等量对照液灌根作为对照组。于灌施后不同时间点采集第 5 片叶, 采样方案同 1.6.2 节。

1.6.4 施用时期与方式组合实验

设计 6 种处理组合: 采摘期叶施(P-L)、打顶期叶施(T-L)、两期双次叶施(D-L)、采摘期根灌(P-R)、打顶期根灌(T-R)、两期双次根灌(D-R)。以喷施对照液为对照。于采摘期处理后 72 h 采集烟叶, 采样方案同 1.6.2 节。

烟草烟叶中烟碱含量检测参照李佳颖等^[17]的方法。

1.7 数据统计与分析

采用 GraphPad Prism (v8.0) 进行图表绘制, 并运用 IBM SPSS Statistics (v25.0) 对数据进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 Pu17 的基因组序列组装及基本信息

为解析产脲节杆菌(*P. ureafaciens*)菌株 Pu17 的遗传背景, 本研究对其进行了全基因组测序并完成图水平的组装。组装结果表明, Pu17 的完整基因组由 1 个环状染色体和 3 个质粒构成(图 1), 总大小为 4.47 Mb, 整体 G+C 含量为 63.34%。共预测到 4 155 个蛋白编码基因(coding sequence, CDS), 总长度为 3.97 Mb, 占基因组总长度的 88.73%。

染色体大小为 4 049 701 bp, G+C 含量为 63.57%。3 个附属质粒的大小与碱基组成各异: 其中最大者为质粒 1 (219 760 bp, G+C 含量 60.11%), 其次为质粒 2 (113 710 bp, G+C 含量

61.65%) 和质粒 3 (87 341 bp, G+C 含量 62.81%)。此外, 基因组中注释到 6 个 5S rRNA 基因、6 个 16S rRNA 基因、23 个 23S rRNA 基因、53 个 tRNA 基因以及 4 个 sRNA 基因(表 1)。Pu17 基因组已上传 ScienceDB, DOI: 10.57760/sciencedb.j00231.00039。

2.2 基于 ANI 比对的属间物种分类鉴定

Pu17 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增和测序, 确认其全长为 1 365 bp。通过将 16S rRNA 基因上传至 NCBI 进行 BLAST 比对, Pu17 与 *Arthrobacter* sp. HS-B2 (GenBank 登录号为 F901933.1) 的 16S rRNA 基因高度相似, 相似度为 100.00%^[17]。基于 ANI 分析, 菌株 Pu17 与产脲节杆菌(*P. ureafaciens*) 中的参考菌株(GenBank 登录号为 GCA_017357445.1) 的 ANI 值为 96.51%, 高于细菌物种划界的公认阈值(95%), 因此确定 Pu17 属于该物种。与之相比, Pu17 与其余分析的 45 个菌株间的 ANI 值均低于 90.00%, 进一步支持其与 *P. ureafaciens* 在系统发育上的紧密关系(图 2A)。基于上述结果, 该菌株被鉴定为产脲节杆菌(*P. ureafaciens*) Pu17。为进一步探究其基因组特征, 将 Pu17 与从 NCBI 数据库中获取的 12 株节杆菌属(*Arthrobacter*) 菌株的核心染色体(染色体 1) 进行了比较。结果显示, 这些染色体在整体上保持较高的序列相似性与共线性, 体现了该属核心基因组的保守性。然而, 在约 1 700–2 000 kb 区域(标记为 b1) 观察到显著的结构差异。该区域在 Pu17 中包含 287 个编码序列(CDS 编号为 Epu17GL001547–Epu17GL001833)。功能注释表明, 这些基因广泛参与多种生物学过程, 主要包括代谢(96 个基因)、环境信息应答(34 个基因) 和遗传信息处理(13 个基因), 此外也涉及细胞过程、人类疾病及器官系统等相关功能(分别为 9、7 和 9 个基因)。该差异区域的基因组特征可能反映了 Pu17 在特定代谢途径或环境适应性方面与其他节杆菌属菌株的功能分化(图 2B)。

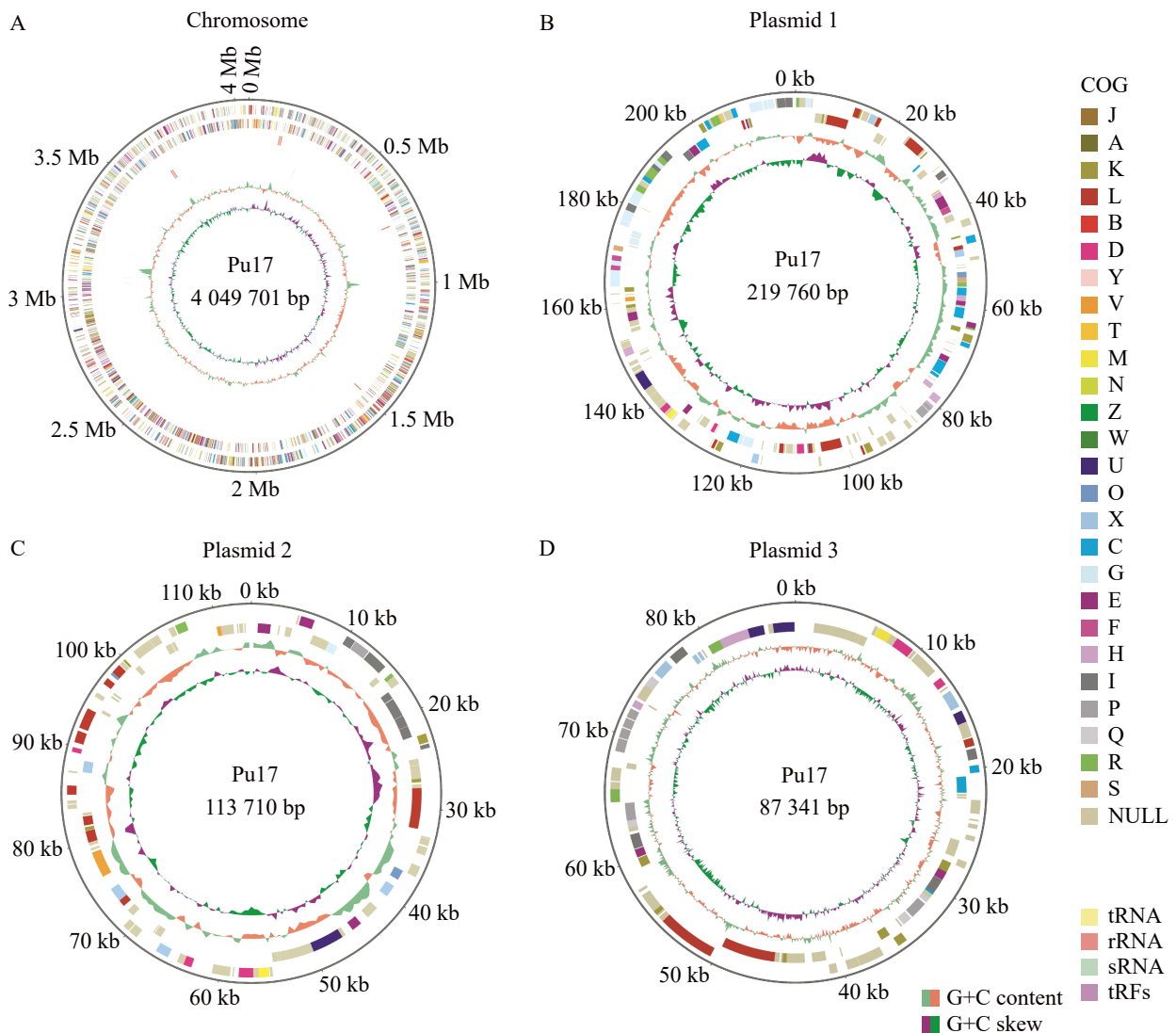


图1 产脉节杆菌Pu17基因组图谱

Figure 1 Genomic maps of *Peanarthrobacter ureafaciens* Pu17. A: Complete chromosome map of Pu17; B: Assembly map of plasmid 1; C: Assembly map of plasmid 2; D: Assembly map of plasmid 3.

2.3 基于 ANI 比对的种间物种分类鉴定

为明确菌株 Pu17 的分类地位, 本研究基于 ANI 将其与多个产脉节杆菌(*P. ureafaciens*)菌株进行了比较基因组分析。所有比对结果显示, Pu17 与这些菌株的 ANI 值介于 96.39%–96.95%, 均稳定高于细菌物种界定的公认阈值(95%), 其中与 *P. ureafaciens* AAC22 的相似性最高(96.95%)。该结果强有力地支持将 Pu17 归类为产脉节杆菌, 并表明其与该物种的核心菌群具

有密切的系统发育关系。进一步将 Pu17 的染色体 1 与从 NCBI 数据库获取的 9 株 *P. ureafaciens* 的染色体 1 进行共线性比较(图 3B)。结果显示, Pu17 染色体 1 与这些菌株在大部分区域呈现高度相似性, 表明核心染色体结构保守。但在两处特定区域(约 990–1 010 kb 与 3 100–3 150 kb)存在明显差异。这些差异区域分别对应以下基因簇及其预测功能。位于 990–1 010 kb 的区域: 该区域包含 *terC*、*arsR*、*dptH* 基因, 分别编码

表1 产脲节杆菌Pu17基因组基本特征

Table 1 Genomic features of *Peanarthrobacter ureafaciens* Pu17

Genome features	Value
Genome size/bp	4 470 512
G+C content/%	63.34
Gene number	4 155
Chromosome size/bp	4 049 701
Chromosome G+C content/%	63.57
Protein-coding genes/(CDS)	4 155
Total CDS length/bp	3 966 174
5S rRNA genes	6
16S rRNA genes	6
tRNA genes	53
23S RNA genes	23
sRNA genes	4

硝酸盐抗性蛋白 TerC、参与砷/锑胁迫应答的 ArsR 家族转录调控因子，以及依赖 DNA 硫修饰的限制性内切酶 DptH。位于 3 100–3 150 kb 的区域：该区域基因簇功能更为多样，主要涉及细胞壁/荚膜多糖合成、糖核苷酸代谢及部分次级代谢途径。细胞壁/荚膜合成相关：如壁酸转运蛋白 (TagH, tagG)、糖基转移酶 (WcaI, MshA)、壁酸转移酶 (TagT_U_V) 及 CDP-核糖醇磷酸转移酶 (TarL) 等。糖核苷酸代谢相关：如葡萄糖-1-磷酸胸苷酰转移酶 (RfbA)、dTDP-鼠李糖合成酶 (RmlA, RffH, RfbCD, RmlCD) 和 UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (GalU) 等。其他功能：如纤维素合酶 (BcsA)、几丁质酶、信号肽酶 I (SipW)、二酰甘油激酶 (DagK)、苯乙酰辅酶 A 代谢酶 (PaaG, PaaE) 以及辅酶 F420 氢化酶亚基 (FrhB) 等。这些基因簇的存否或序列差异可能反映了 Pu17 在环境适应(如重金属抗性)、细胞表面结构合成或特定代谢潜能方面与其他产脲节杆菌菌株的分化。

2.4 Pu17 菌株基因功能注释

通过对 COG、GO 及 KEGG 数据库进行功

能注释分析，Pu17 菌株的基因组显示出显著的代谢功能特征。在 COG 分类中，注释到的 3 587 个基因主要富集于代谢(metabolism)类别，共 1 772 个基因，表明该菌株具有活跃的代谢潜能(图 4A)。GO 注释结果进一步支持这一发现：在 7 606 个注释基因中生物过程(biological process)涵盖基因数量最多(共计 3 888 个)，其中又以细胞过程(cellular process) (共计 1 856 个基因)和代谢过程(metabolic process) (共计 1 666 个基因)为主(图 4B)。同样地，KEGG 通路分析显示，在总计 3 180 个注释基因中隶属于代谢(metabolism)大类的基因多达 2 441 个，数量远超环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)等其他类别(图 4C)。这些结果共同表明，Pu17 基因组编码了丰富且多样化的代谢功能体系。

2.5 产脲节杆菌 Pu17 菌株的基因组分析

产脲节杆菌菌株 Pu17 的完整基因组由一条环状染色体和 3 个质粒组成。染色体大小为 4 049 701 bp，G+C 含量为 63.57%；3 个质粒的大小分别为 219 760、113 710 和 87 341 bp，共同构成总大小为 4.47 Mb、平均 G+C 含量为 63.34% 的完整基因组(表 2)。比较基因组分析显示，该物种的基因组结构呈现一定多样性，其质粒数量在不同菌株间差异显著，例如菌株 *P. ureafaciens* L-1 不含任何质粒，而菌株 *P. ureafaciens* SD-1 则携带多达 7 个质粒。在此背景下，Pu17 的基因组总大小(4.47 Mb)和 G+C 含量均处于该物种已知的范围内(基因组大小 4.40–5.10 Mb，G+C 含量约 63.50%)，符合产脲节杆菌的典型基因组特征。

2.6 菌株 Pu17 烟碱代谢基因簇分析

KEGG 注释结果表明，菌株 Pu17 的基因组携带与吡啶途径烟碱代谢相关基因高度同源的序列。分析发现，参与烟碱降解的关键基因簇主要分布于质粒 1 上，另有 1 个基因位于质粒

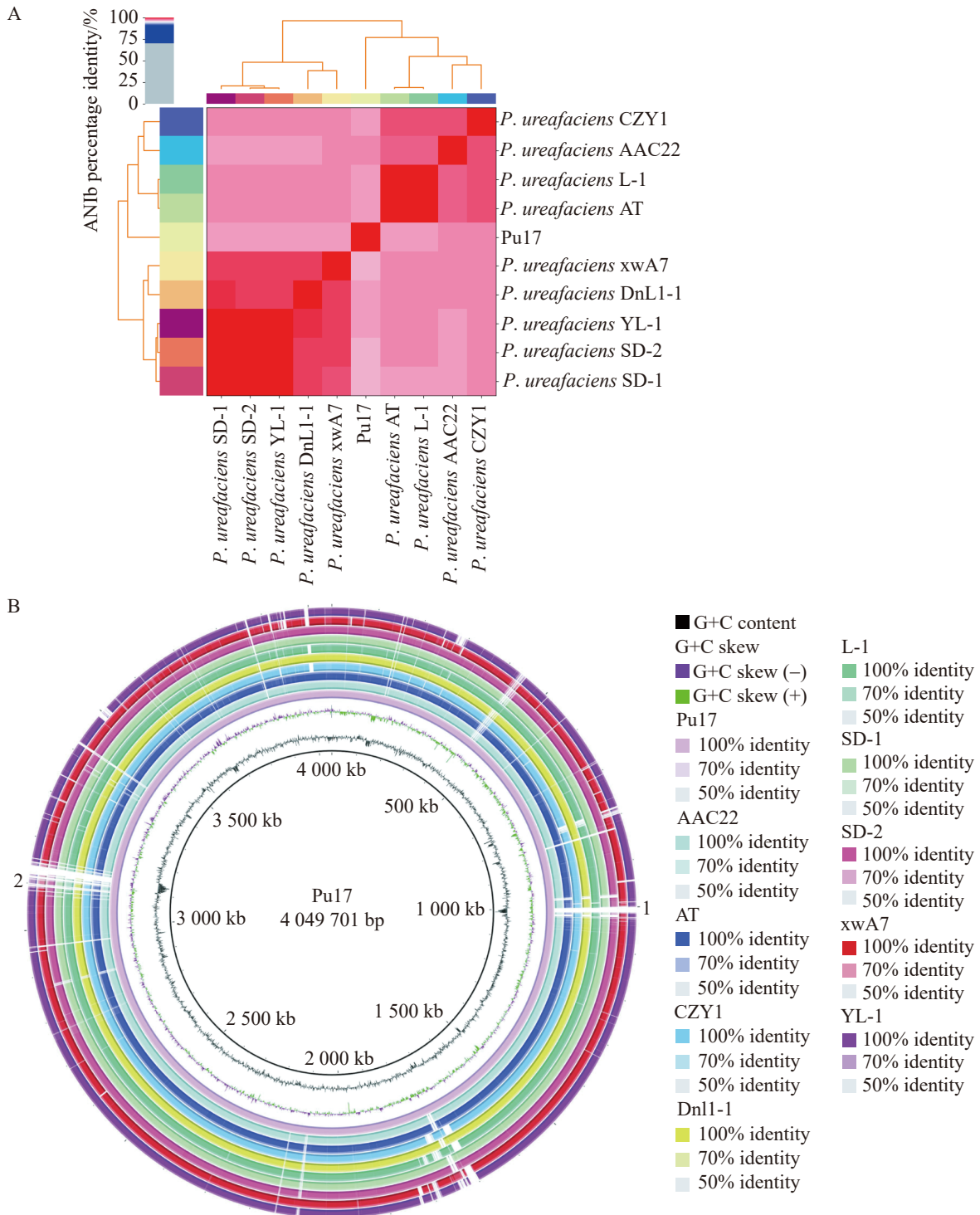


图3 Pu17与9株近缘菌株的平均核苷酸一致性(ANI)比较

Figure 3 Average nucleotide identity (ANI) between strain Pu17 and nine closely related strains. A: ANI-based comparison between Pu17 and *Peaenarthrobacter ureafaciens*; B: Chromosomal structural alignment between Pu17 and *Peaenarthrobacter ureafaciens*.

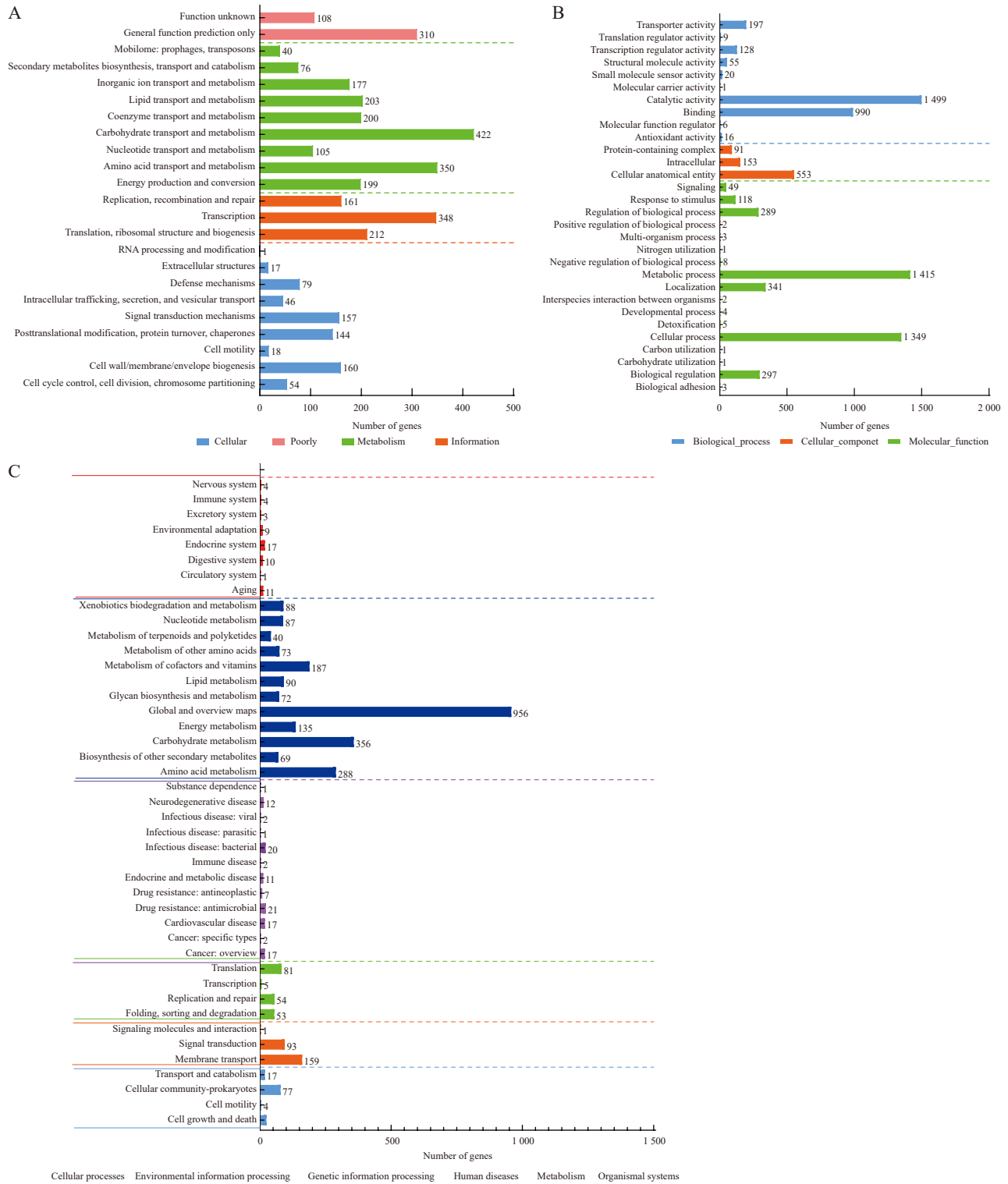


图4 菌株Pu17全基因组功能注释谱

Figure 4 The genome-wide functional annotation profile of strain Pu17. A: COG annotation diagram; B: GO annotation diagram; C: KEGG annotation diagram.

表2 菌株Pu17和10株产脲节杆菌菌株的基因组基本信息

Table 2 Basic genomic information of strain Pu17 and 10 strains of *Peanarthrobacter ureafaciens*

Strain names	Genome size/Mb	G+C content/%	ANI value/%	Plasmids	GenBank number
Pu17	4.47	63.34	-	Chromosome, plasmid 1, plasmid 2, plasmid 3	-
<i>P. ureafaciens</i> DnL1-1	4.7	63.50	96.51	Chromosome, pADNL1, pADNL2	GCA_017357445.1
<i>P. ureafaciens</i> SD-1	5.1	63.50	96.39	Chromosome, unnamed 1, unnamed 2, unnamed 3, unnamed 4, unnamed 5, unnamed 6, unnamed 7	GCA_025919765.1
<i>P. ureafaciens</i> SD-2	4.9	63.50	96.45	Chromosome, unnamed 1, unnamed 2, unnamed 3, unnamed 4	GCA_025919745.1
<i>P. ureafaciens</i> YL1	4.7	63.50	96.49	Chromosome	GCA_014076395.1
<i>P. ureafaciens</i> AAC22	5.1	63.50	96.95	Chromosome, pAAC22-1, pAAC22-2, pAAC22-3, pAAC22-4	GCA_011393315.3
<i>P. ureafaciens</i> xwA7	4.7	63.00	96.47	Chromosome, plasmid	GCA_051027645.1
<i>P. ureafaciens</i> L-1	4.4	63.50	96.80	Chromosome	GCA_032598885.1
<i>P. ureafaciens</i> AT	4.6	63.50	96.78	Chromosome, pA, pB, pC, pD	GCA_022810785.1
<i>P. ureafaciens</i> CZY1	4.4	63.50	96.87	Chromosome, pCZY	GCA_016694995.1

3, 2 个基因位于染色体(图 5A)。这些基因包括 *ndhC*、*ndhA*、*6-hlno*、*kdhA*、*dhponh*、*dhpH*、*nicF*、*nicE*、*maiA*、*nboR*、*mao*、*mabO*、*gabD* 等, 共同构成协同降解烟碱的遗传基础(图 6)。

进一步比对显示, Pu17 中多个烟碱代谢基因与已知同源基因相似度较高(表 3)。其中, 尼古丁脱氢酶亚基 C (*ndhC*)、6-羟基假氧化尼古丁脱氢酶 α 亚基(*kdhA*)、2,6-二羟基吡啶-3-单加氧酶(*dhpH*)、尼古丁蓝氧化还原酶(*nboR*)及 4-甲基丁酸氧化酶(产甲醛) (*mabO*)的相似度均为 100.0%; (S)-6-羟基尼古丁氧化酶(*6-hlno*)为 99.8%; 2,6-二羟基假氧化尼古丁水解酶(*dhponh*)为 99.7%; 马来酰胺酸酰胺水解酶(*nicF*)为 98.9%; 马来酸异构酶(*nicE*)为 98.8%; 4-甲基丁酸氧化酶(产甲胺) (*mao*)为 99.8%。此外, 马来酸顺反异构酶(*iso*)、2,5-二羟基吡啶双加氧酶(*hpo*)和尼古丁脱氢酶亚基 A (*ndhA*)的相似性分别为 97.2%、94.7% 和 91.6%, 为相似度差异最为显著的 3 个基因(图 5A、表 3)。

2.7 Pu17 代谢烟碱产物 MS/MS 检测

基于 MS/MS 分析技术, 对菌株 Pu17 代谢烟碱的产物进行了鉴定。如图 5 所示, 在代谢过程中检测到 3 种关键中间产物, 分别为 6-羟基假氧尼古丁(6-hydroxypseudooxynicotine)、6-羟基-N-甲基肌胺(6-hydroxy-N-methylmyosmine)以及马来酸盐(maleamate), 三者均属于烟碱吡啶降解途径的特征代谢物。具体而言, 6-羟基-N-甲基肌胺的母离子质荷比(*m/z*)为 195.112 7, 主要碎片离子为 66.034 2、94.028 7、122.023 8、148.075 5 和 164.070 8 *m/z*, 与图 5B 的质谱特征一致。6-羟基假氧尼古丁对应的母离子质荷比(*m/z*)为 177.102 2, 其碎片离子包括 103.054 3、120.080 8、130.065 0 及 148.075 7 *m/z*, 与图 5C 所示的质谱信号高度匹配。马来酸盐的母离子质荷比(*m/z*)为 118.086 4 *m/z*, 碎片离子包括 58.065 5、71.013 3 和 99.008 0 *m/z*, 与图 5D 的谱图吻合良好。上述代谢产物的鉴定结果进一步证实, Pu17 主要通过吡啶途径降解烟碱(图 6), 为其烟碱代谢机制提供了直接的质谱证据。

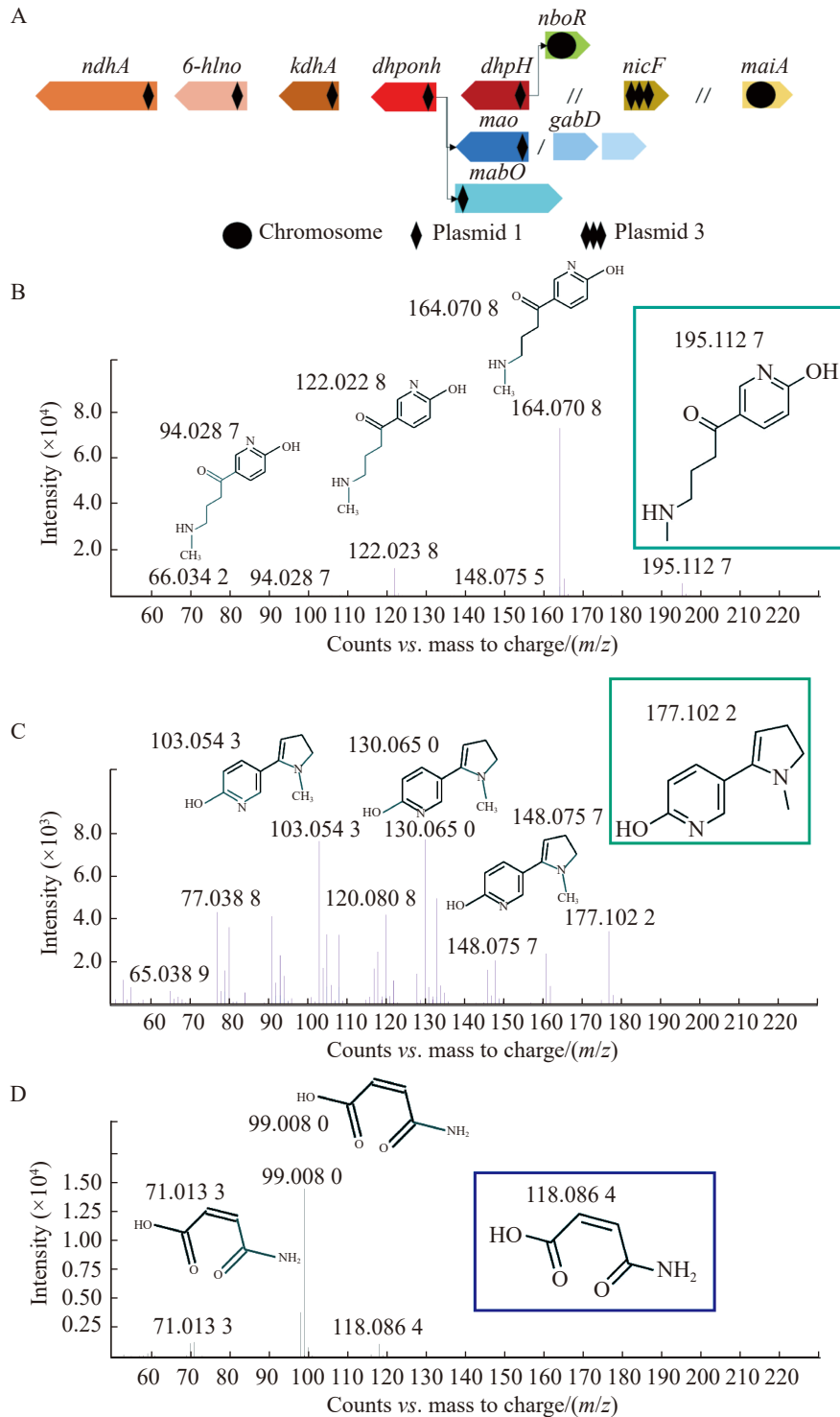


图5 Pu17烟碱降解基因簇及代谢中间产物质谱分析

Figure 5 Nicotine degradation gene cluster and mass spectrometric analysis of metabolic intermediates in Pu17.

A: Composition of the nicotine degradation gene cluster; B: MS/MS spectrum of 6-hydroxy-*N*-methylmyosmine; C: MS/MS spectrum of 6-hydroxypseudoxy-nicotine; D: MS/MS spectrum of maleate.

表3 菌株Pu17基因组中烟碱降解相关基因

Table 3 Nicotine degradation-related genes identified in the Pu17 genome

EC ID	Gene names	Gene mapping	Gene function	KEGG similarity/%
1.5.99.4	<i>ndhC</i>	Plasmid 1: 72 049: 74 763: -	Nicotine dehydrogenase subunit C	100.0
	<i>ndhA</i>	Plasmid 1: 74 986: 75 618: -	Nicotine dehydrogenase subunit A	100.0
1.5.3.5	<i>nctB, 6-hlno</i>	Plasmid 1: 70 704: 71 966: -	(S)-6-hydroxynicotine oxidase	99.8
1.5.99.14	<i>kdhA</i>	Plasmid 1: 66 784: 67 674: +	6-hydroxypseudooxynicotine dehydrogenase subunit alpha	100.0
3.7.1.19	<i>dhponh</i>	Plasmid 1: 62 701: 63 786: +	2,6-dihydroxypseudooxynicotine hydrolase	99.7
1.14.13.10	<i>dhpH</i>	Plasmid 1: 57 606: 58 799: -	2,6-dihydroxypyridine 3-monooxygenase	100.0
3.5.1.107	<i>nicF</i>	Plasmid 3: 72 277: 72 828: +	Maleamate amidohydrolase	98.9
5.2.1.1	<i>nicE, maiA</i>	Chromosome 1: 3 883 908: 3 884 636: +	Maleate isomerase	98.8
1.1.1.328	<i>nboR</i>	Chromosome 1: 3 328 960: 3 329 571: +	Nicotine blue oxidoreductase	100.0
1.5.3.21	<i>mao</i>	Plasmid 1: 29 566: 30 831: -	4-methylaminobutanoate oxidase (methylamine-forming)	99.8
1.5.3.19	<i>mabO</i>	Plasmid 1: 36 195: 38 669: -	4-methylaminobutanoate oxidase (formaldehyde-forming)	100.0
1.2.1.16	<i>gabD</i>	Chromosome 1:	Succinate-semialdehyde dehydrogenase/ glutarate-semialdehyde dehydrogenase	85.4
1.2.1.79		(1 165 530: 1 167 011: +)		
1.2.1.20		(1 773 781: 1 775 220: -)	99.4	
		(1 871 582: 1 872 937: +)	99.3	
		Plasmid 1: (32 025: 33 263: +)	91.7	
		(194 584: 196 068: -)	91.4	
		(217 819: 219 195: +)	71.8	
	Plasmid 2: 12 595: 13 974: +	90.4		

2.8 Pu17 通过不同方式处理对活体烟草烟叶中烟碱的降解效果

本研究测定了 Pu17 通过不同方式处理对活体烟草烟叶中烟碱的降解效果。结果表明, 叶面喷施 Pu17 可有效降低烟叶烟碱含量。其中, 喷施 3 次的处理组效果最为显著, 烟碱含量较对照组下降 19.98%; 喷施 1、2、4、5 次的处理组之间虽无显著差异, 但烟碱含量均显著低于对照组(图 7A)。根灌处理同样显著降低了烟叶烟碱含量, 在处理后 42 h 烟碱降低幅度最大, 降解率为 13.46%; 24 h 和 72 h 的降解

率分别为 8.87% 和 9.18% (图 7B)。不同根灌次数处理均能显著降低烟碱含量, 其中根灌 3 次和 4 次的降解效果较为突出, 降解率分别为 13.45% 和 15.60%, 且显著优于根灌 1 次和 2 次处理(图 7C)。此外, 不同施用时期的结果显示, 仅在打顶期进行喷施($P=0.936$)或根灌($P=0.525$)对烟碱含量无显著影响; 而在采摘期($P=0.035$)与双期喷施($P=0.012$)均可显著降低烟碱含量, 双期根灌也呈现显著的降低趋势($P=0.012$)。其中, 双期喷施处理的效果最佳, 烟碱降解率达到 14.00% (图 7D)。

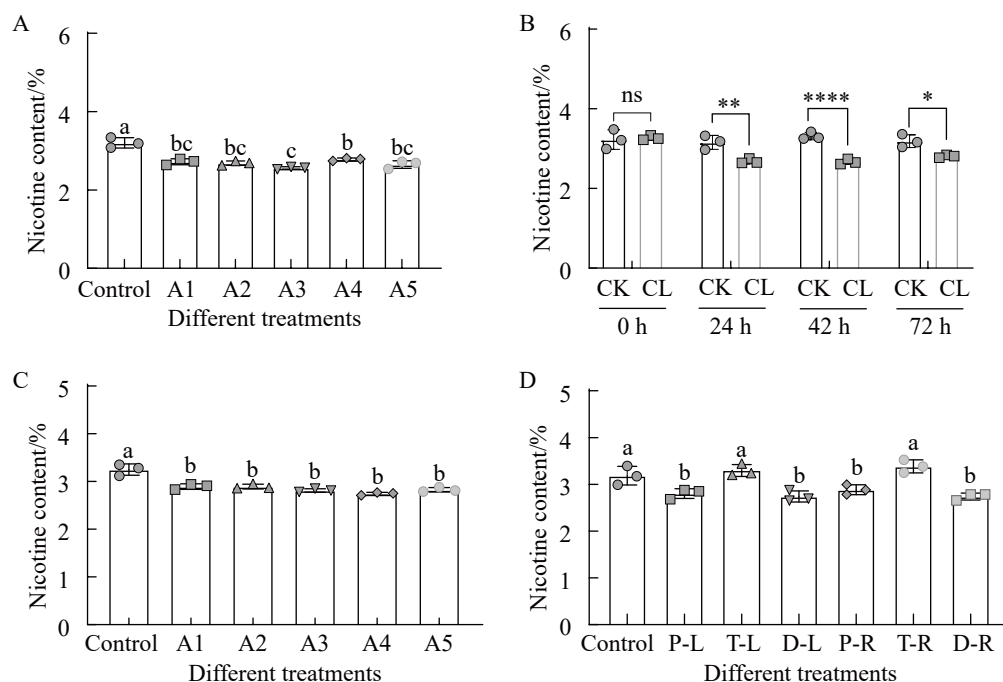


图7 Pu17不同处理方式对活体烟草烟叶烟碱含量的影响

Figure 7 Effects of different application methods of Pu17 on nicotine content in tobacco leaves *in vivo*. A: Effects of different frequencies of foliar spray; B: Effects of root irrigation; C: Effects of different frequencies of root irrigation; D: Effects of foliar spray at different application timings. Values in the figure represent means \pm standard error ($n=3$). Different lowercase letters and asterisks above the bars indicate significant differences among treatments ($P<0.05$), and the Sidak method (B) and the Tukey method (A, C, and D) were used for multiple comparisons. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$; ns: No significant.

3 讨论与结论

全基因组测序技术的快速发展显著推动了比较基因组学研究的深入^[18]。基于微生物基因组 ANI 的分析方法已成为物种分类与鉴定不可或缺的重要工具^[19-20]。该技术不仅深化了对微生物代谢网络及其调控机制的理解,也为新型抗生素、工业酶及污染物降解相关基因资源的挖掘提供了强大手段,拓展了其在生物技术领域的应用前景。研究表明,通过将目标基因组与多株已知菌株进行系统发育比较能够构建可靠的发育树,进而揭示物种适应性进化及功能多样性的遗传基础^[21]。本研究综合运用生物信息学方法筛选具有烟碱降解潜力的微生物资源,系统解析其降解相关基因及代谢通路,以阐明

尼古丁生物降解的分子机制,从而为环境污染修复与微生物资源开发提供理论依据。

节杆菌 (*Arthrobacter*) 隶属于放线菌门 (*Actinomycetota*) 节杆菌科 (*Arthrobacteraceae*), 为革兰氏阳性菌, 在土壤环境中分布广泛。已报道的菱形节杆菌 (*Arthrobacter rhombi*) 完整基因组大小为 3.48 Mb, G+C 含量为 69.15%, 共预测编码 3 170 个蛋白质, 并含有 50 个 tRNA 基因及 7 个 rRNA 基因^[22]。产脲节杆菌 (*P. ureafaciens*) L-1 基因组大小约为 4.3 Mb, G+C 含量为 63.5%, 在 COG、GO 和 KEGG 数据库中获得功能注释的基因分别有 3 760、3 830 和 3 845 个^[23]。本研究所用菌株 Pu17 含有 1 条环状染色体及 3 个质粒, 基因组总大小为 4.47 Mb, G+C 含量为 63.34%,

共编码 4 155 个预测蛋白编码序列。功能注释显示, 分别在 GO、COG 和 KEGG 数据库中注释到 7 606、3 587 和 3 180 个蛋白, 其中代谢相关基因在 3 个数据库中均占较高比例, 此特征与 *P. ureafaciens* L-1 相似。系统发育分析表明, Pu17 与 *P. ureafaciens* (GCA_017357445.1) 的 ANI 值为 96.51%, 证实两者亲缘关系密切, 因此将该菌株鉴定为 *P. ureafaciens* Pu17。比较基因组学分析进一步揭示, Pu17 的染色体在 990–1 010 kb 与 3 100–3 150 kb 处与其他产脉节杆菌存在差异, Pu17 基因组中独特的基因簇共同构成了其区别于其他产脉节杆菌菌株的多层次适应性策略。在环境胁迫抵抗层面, *terC* 和 *arsR* 等基因使其具备了对砷、镉等重金属的特异性解毒能力, 而 *dptH* 则可能提供了基于 DNA 硫修饰的防御系统, 共同增强了其在复杂或污染环境中的生存优势。在细胞表型层面, 大量细胞壁/荚膜合成及糖核苷酸代谢相关基因(如 *tagH/G*、*wcaI*、*rmlA*、*galU* 等)的存在, 暗示其细胞表面多糖组成与结构可能发生显著重塑, 这直接影响其黏附、生物膜形成、抗逆性及与宿主或环境的相互作用。在代谢潜能拓展层面, *bcsA*、几丁质酶、*paaG/E* 及 *frhB* 等基因的携带, 使其获得了合成纤维素、降解几丁质、利用芳香化合物(如苯乙酸)以及可能参与特殊氧化还原反应(辅酶 F420 途径)的潜在能力, 极大地扩展了其碳源利用范围和生态位宽度。

微生物在烟草废弃物治理中展现出重要应用潜力, 其烟碱降解功能对于减轻环境污染具有关键作用^[24-25]。目前, 细菌降解尼古丁的途径已明确的主要有 3 种: 以节杆菌属为代表的吡啶途径, 其核心是通过羟基化打开烟碱的吡啶环^[26]; 以假单胞菌属为代表的吡咯途径, 主要攻击吡咯烷环^[27]; 以及以根癌农杆菌为代表的吡啶-吡咯混合途径^[28-29]。本研究通过 MS/MS 技术分析了菌株 Pu17 降解烟碱的中间代谢产物, 检测到 6-羟基-N-甲基肌胺、6-羟基假氧尼古丁和马来酸盐等关键中间体(图 5B–5D)。这些

产物的组成特征表明, Pu17 主要通过吡啶途径实现烟碱的降解。

基因组分析进一步支持了这一结论。Pu17 的烟碱降解相关基因(如 *nbor*、*mao*、*sad*、*coxD*、*nit*、*coxG*、*dhph*、*pkc*、*pnh*、*kdhL*、*kdhM*、*6-hlno*、*ndhL*、*modC* 等)主要分布于质粒 1 上, 另有少数位于质粒 3 和染色体上, 这些基因协同参与了烟碱的降解过程。本研究结果与其他相关报道相互印证。例如, Wang 等^[7]对嗜烟碱节杆菌中负责二次羟基化的 *kdh* 基因进行了深入研究; 对新型嗜烟节杆菌 aRF-1 的代谢物分析提示其可能存在多条代谢途径^[30]; 而在 *P. nicotinovorans* 中也鉴定出包括 *nboR*、*mao*、*6-hlno* 等在内的多个关键基因^[31]。这些研究共同勾勒出吡啶途径复杂的酶学基础。此外, 李旭^[13]的研究表明, 异源表达来自其他菌株的关键酶(如 6Hlno、Dhponh、Dhph)能有效提升烟叶中烟碱的降解率, 这为利用关键酶进行应用开发提供了思路。综合 MS/MS 代谢产物分析与全基因组测序结果, 本研究证实产脉节杆菌 Pu17 采用吡啶途径降解烟碱(图 6)。

在降解效能方面, Pu17 表现出较强的烟碱降解能力。当以 1% 的接种量接入初始烟碱浓度为 2 g/L 的培养基时, 48 h 内即可降解大部分烟碱^[17]。在烟草植株的应用试验中, Pu17 同样表现出显著的降解效果。叶面喷施试验显示, 喷施 3 次的处理组烟碱降低幅度最大, 达 19.98%, 推测过度施用 Pu17 导致的高菌群密度, 可能通过群体感应诱导转换, 从利于定殖转向游动生存^[32], 反而减少 Pu17 在烟叶上的定殖数量, 导致喷施 3 次处理组烟碱含量最低。喷施 1、2、4、5 次的处理组间虽无显著差异, 但烟碱含量均显著低于对照组(图 7A)。根灌处理也能有效降低烟碱含量, 在处理 42 h 的降幅最大, 为 13.46% (图 7B)。不同根灌次数处理均能显著降低烟碱, 但各次数组间差异不显著(图 7C)。此外, 处理时期对效果有重要影响: 打顶期单独进行喷施或根灌对烟碱含量无显著影响, 根据

之前的研究 Pu17 施用于烟叶后, 烟叶中的烟碱虽显著降低, 但是随着时间的推移呈现回补现象, 推测打顶期和采摘时长时间间隔可能导致烟叶内烟碱回补至不显著状态^[17]; 而在采摘期与双期进行处理, 均可显著降低烟碱, 其中以双期喷施处理效果最佳, 降解率达 14.00% (图 7D)。本研究结果与利用其他节杆菌及其酶制剂进行烟碱降解的报道相呼应, 共同印证了该类微生物的应用潜力。例如, 在烟秆与污泥堆肥体系中接种嗜组氨酸节杆菌 EA-17, 可使烟碱降解率提升至 49.33%, 显著高于未接种的对照组 (28.27%)^[33]。利用烟草节杆菌 GYC103 发酵烟叶, 可同时降低烟碱、淀粉和蛋白质含量, 并提升糖分^[16]。另有研究通过应用节杆菌 Z3 来源的烟碱脱氢酶粗酶液处理白肋烟叶, 使烟碱降解率达到 49.32%, 成功将其烟碱含量调整至与烤烟相当的水平^[34]。Pu17 菌液喷施于大田烟叶, 可能受制于田内的高温和太阳直晒等不可避免的环境因素破坏 Pu17 的稳态, 导致细胞裂解死亡, 从而烟碱降解率低于上述处理, 但活体烟叶中烟碱含量 14.00% 的降解率仍满足工业预期。这些研究从不同角度(全细胞、发酵、酶制剂)支撑了微生物法降解烟碱的可行性。

综上所述, 本研究通过整合比较基因组学、代谢产物分析与降解效能评估, 系统阐明了菌株 Pu17 通过吡啶途径降解烟碱的机制。实验表明, Pu17 在烟草植株应用中均表现出高效的烟碱降解能力, 在已报道的其他节杆菌属菌株或酶制剂基础上对烟草烟叶进行了活体实验, 进一步凸显了该菌株在烟草废弃物生物修复与烟草制品定向降害方面的应用潜力。未来可通过多技术联用策略系统性提升 Pu17 降解烟碱效能。在菌株改造层面, 可通过过表达其烟碱降解途径中的关键酶基因(如羟甲基化酶、脱氢酶)或引入异源高效基因簇来直接强化代谢通路。在应用策略层面, 可将其与能互补利用降解中间产物、增强定殖能力或抵抗环境胁迫的辅助菌株配伍, 构建稳定高效的复合菌剂。同时, 通

过优化施用条件(如接种密度、温度、pH、营养添加剂及表面活性剂使用)来最大程度激活菌株活力并促进其与烟草基质的接触。为后续基于 Pu17 或其关键酶系开发相应的生物修复技术与产品提供了重要的菌种资源与理论依据。

作者贡献声明

黄应群: 提出概念, 执行调研, 方法论, 数据收集与监管, 数据分析, 撰写文章; 李昂: 提出概念, 执行调研, 方法论, 数据收集与监管, 数据分析; 李佳颖: 执行调研, 方法论, 数据收集与监管, 数据分析; 骆君华: 执行调研, 方法论, 数据收集与监管; 金锦杭: 执行调研, 数据收集与监管; 袁春辉: 执行调研; 许小霞: 获取基金, 提出概念, 数据收集与监管, 监督管理; 金丰良: 获取基金, 提出概念, 方法论, 数据收集与监管, 监督管理。

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] Jiang YH, Zhang YY, Wang X, Zhang FY, Xu SQ, Chen Q, Hong Q, He J, Qiu JG. Isolation and characterization of the 2,5-pyridinedicarboxylic acid-degrading bacterium *Agrobacterium* sp. strain YJ-5[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2023, 76(1): ovac040.
- [2] Zhang Y, Jiang CD, Li YY, Sun JG, Chen ZG, Zhang Q, Sun GW. Screening, identification, and mechanism analysis of starch-degrading bacteria during curing process in tobacco leaf[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1332113.
- [3] 李晓华, 梅枫, 孔雯, 李阳, 马婷婷, 皮婷. 尼古丁微生物降解代谢机制和应用的研究进展[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 36(4): 27-35.
Li XH, Mei F, Kong W, Li Y, Ma TT, Pi T. Research development of nicotine degrading mechanism in microorganisms and their applications[J]. *Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2017, 36(4): 27-35 (in Chinese).
- [4] 郑秀成, 陈泽裕, 陈国庆, 李骏, 钟卫鸿. 烟草废弃物中的难降解有机物的微生物降解研究进展[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2650-2663.
Zheng XC, Chen ZY, Chen GQ, Li J, Zhong WH. Progress in microbial degradation of refractory organics in tobacco waste[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2650-2663 (in Chinese).

- [5] Wang HX, Wang XY, Tang Q, Wang LJ, Mei CY, Shao YH, Xu Y, Lu ZM, Zhong WH. Regulation mechanism of nicotine catabolism in *Sphingomonas melonis* TY by a dual role transcriptional regulator NdpR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(5): e00324-23.
- [6] Li J, Yi FM, Chen GQ, Pan FD, Yang Y, Shu M, Chen ZY, Zhang ZL, Mei XT, Zhong WH. Function enhancement of a metabolic module via endogenous promoter replacement for *Pseudomonas* sp. JY-Q to degrade nicotine in tobacco waste treatment[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(9): 2793-2805.
- [7] Wang L, Mu X, Li WJ, Xu Q, Xu P, Zhang LY, Zhang YB, Wu G. Structural, mechanistic, and functional insights into an *Arthrobacter nicotinovorans* molybdenum hydroxylase involved in nicotine degradation[J]. Molecules, 2021, 26(14): 4387.
- [8] 祁国振, 毛志泉, 胡秀娜, 杜秉海, 葛科, 杨倩倩, 丁延芹. 苹果根际自毒物质降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 330-342.
- Qi GZ, Mao ZQ, Hu XN, Du BH, Ge K, Yang QQ, Ding YQ. Isolation, identification and degradation characteristics of apple rhizosphere autotoxicity compounds-degrading bacteria[J]. Microbiology China, 2016, 43(2): 330-342 (in Chinese).
- [9] 李苏洁, 陈姗姗, 栾天罡. 藻菌共生处理污水的机制与应用研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 918-929.
- Li SJ, Chen SS, Luan TG. Advances in mechanisms and applications of algae-bacteria/fungi symbiosis in sewage treatment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 918-929 (in Chinese).
- [10] 苏丹, 林智慧, 王雪仁, 封磊, 宋萍, 韩晓刚, 李航, 游凯, 刘洁, 黄楠. 1株高效降烟碱烟草内生菌的筛选、鉴定及其代谢途径研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2021, 52(3): 279-286.
- Su D, Lin ZH, Wang XR, Feng L, Song P, Han XG, Li H, You K, Liu J, Huang N. Screening and identification of a highly efficient nicotine-degrading endophyte in tobacco and its metabolic pathways[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2021, 52(3): 279-286 (in Chinese).
- [11] 万虎, 赵海刚, 宋纪真, Jin Byung Rae, 李建洪. 高浓度烟碱降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J]. 烟草科技, 2009, 42(4): 50-53, 64.
- Wan H, Zhao HG, Song JZ, Rae J, Li JH. Screening, identification and degradation characteristics of high concentration nicotine degradation bacterium strain[J]. Tobacco Science & Technology, 2009, 42(4): 50-53, 64 (in Chinese).
- [12] Wen C, Zhang QY, Zhu PC, Hu WR, Jia Y, Yang SH, Huang Y, Yang Z, Chai ZS, Zhai TY, Cao Y, Li DL. High throughput screening of key functional strains based on improving tobacco quality and mixed fermentation[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1108766.
- [13] 李旭. 氯酚假节杆菌BJY-3降解酶在烟草尼古丁降解应用的初步研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2025.
- Li X. Preliminary studies on the application of *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* BGY-3 degrading enzyme in tobacco nicotine degradation[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2025 (in Chinese).
- [14] 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).
- [15] 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).
- [16] 龙章德, 田兆福, 黎新钦, 韦建玉, 刘启斌, 农李政, 李季刚, 白家峰, 申佩弘. 利用烟草节杆菌GYC103发酵提高上部烟叶品质[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1851-1855.
- Long ZD, Tian ZF, Li XQ, Wei JY, Liu QB, Nong LZ, Li JG, Bai JF, Shen PH. Improving the quality of tobacco upper leaves by fermentation using *Arthrobacter nicotianae* GYC103[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(10): 1851-1855 (in Chinese).
- [17] 李佳颖, 郭文龙, 邓征宇, 丁建冰, 刘峰, 李小慧, 袁芳, 黄应群, 李昂, 张舒昊, 金丰良. 一株降解烟碱菌株Pu17的鉴定及其降解特性分析[J]. 环境昆虫学报, 2025, 47(1): 270-281.
- Li JY, Guo WL, Deng ZY, Ding JB, Liu F, Li XH, Yuan F, Huang YQ, Li A, Zhang SH, Jin FL. Identification and degradation characteristics of a nicotine-degrading strain Pu₁₇[J]. Journal of Environmental Entomology, 2025, 47(1): 270-281 (in Chinese).
- [18] Caputo A, Fournier PE, Raoult D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria[J]. Biology Direct, 2019, 14(1): 5.
- [19] Zhu XY, Wang WW, Xu P, Tang HZ. Complete genome sequence of *Sphingomonas* sp. strain NIC1, an efficient nicotine-degrading bacterium[J]. Genome Announcements, 2016, 4(4): e00666-16.
- [20] Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, DeBoy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit Y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome" [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(39): 13950-13955.
- [21] 赵凡冲, 张豪洋, 贾玮, 黄五星, 韩丹, 许自成, 党炳俊. 烟碱降解菌株LN-1的分类鉴定及全基因组分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2023, 42(2): 143-161.
- Zhao FC, Zhang HY, Jia W, Huang WX, Han D, Xu ZC, Dang BJ. Identification and whole genome analysis of strain LN-1 with the ability to degrade nicotine[J]. Genomics and Applied Biology, 2023, 42(2): 143-161 (in Chinese).

- [22] 卢雨欣, 颜宏, 白亚妮, 梁建强, 冯志珍. 菱形节杆菌 BFL-3 分离鉴定及耐盐碱机理研究[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(7): 1501-1512.
Lu YX, Yan H, Bai YN, Liang JQ, Feng ZZ. Isolation, identification and saline-alkaline tolerance mechanism study of *Arthrobacter rhombi* strain BFL-3[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(7): 1501-1512 (in Chinese).
- [23] 罗晨曦. 莠去津降解菌株 *Paenarthrobacter ureafaciens* L-1 的筛选及其降解特性和途径研究[D]. 南宁: 广西大学, 2023.
Luo CX. The isolation of atrazine degrading strain *Paenarthrobacter ureafaciens* L-1 and its degradation characteristics and pathways[D]. Nanning: Guangxi University, 2023 (in Chinese).
- [24] Li AW, Qiu JG, Chen DZ, Ye JX, Wang YH, Tong L, Jiang JD, Chen JM. Characterization and genome analysis of a nicotine and nicotinic acid-degrading strain *Pseudomonas putida* JQ581 isolated from marine[J]. Marine Drugs, 2017, 15(6): 156.
- [25] Tang HZ, Yao YX, Zhang DK, Meng XZ, Wang LJ, Yu H, Ma LY, Xu P. A novel NADH-dependent and FAD-containing hydroxylase is crucial for nicotine degradation by *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(45): 39179-39187.
- [26] Igloi GL, Brandsch R. Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid PAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a PAO1-dependent nicotine uptake system[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(6): 1976-1986.
- [27] Duan J, Jiang W, Cheng ZY, Heikkila JJ, Glick BR. The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58640.
- [28] Li HL, Xie KB, Yu WJ, Hu LJ, Huang HY, Xie HJ, Wang SN. Nicotine dehydrogenase complexed with 6-hydroxypseudoxyntocine oxidase involved in the hybrid nicotine-degrading pathway in *Agrobacterium tumefaciens* S33[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(6): 1745-1755.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] El-Sabeh A, Mlesnita AM, Mihasan M. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of nicotine metabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* ATCC 49919[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2025, 199: 106017.
- [32] Ye JX, Qiu WQ, Xie J. Quorum sensing systems in biofilm formation and the potential application of natural quorum sensing inhibitors in aquatic product preservation[J]. Food Research International, 2025, 221: 117623.
- [33] 伍良伟. 降解烟碱微生物的筛选及在烟秆腐熟发酵中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
Wu LW. Isolation of nicotine degradation microbe and its application in the tobacco stalks composting fermentation[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [34] 张文龙, 张相辉, 寇霄腾, 王广超, 帖金鑫, 马林. 节杆菌 Z3 粗酶液降解白肋烟烟碱条件优化[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2013, 28(3): 20-23.
Zhang WL, Zhang XH, Kou XT, Wang GC, Tie JX, Ma L. Conditions optimization of *Arthrobacter* Z3 crude enzyme solution degradate nicotine in the Burley tobacco[J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science Edition), 2013, 28(3): 20-23 (in Chinese).