

假单胞菌属微生物对尼古丁降解的研究进展

王坤^{1,2}, 金伊楠³, 李翔², 蔡君兰², 于宏晓^{*1}, 张豪洋^{*1}, 岳勇¹, 张东海¹

1 山东中烟工业有限责任公司, 山东 济南 250104

2 北京生命科技研究院, 北京 102200

3 江苏中烟工业有限责任公司南京卷烟厂, 江苏 南京 210012

王坤, 金伊楠, 李翔, 蔡君兰, 于宏晓, 张豪洋, 岳勇, 张东海. 假单胞菌属微生物对尼古丁降解的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2797-2808.

WANG Kun, JIN Yinan, LI Xiang, CAI Junlan, YU Hongxiao, ZHANG Haoyang, YUE Yong, ZHANG Donghai. Research progress in nicotine degradation by *Pseudomonas*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2797-2808.

摘要: 尼古丁是烟草中含量最多的一种生物碱, 对环境和人体都会造成很大的危害。微生物能将尼古丁作为生长所需的能量来源, 是高效的环境修复能手。假单胞菌属(*Pseudomonas*)生长迅速且对环境具有较强的适应力, 能够利用尼古丁作为唯一碳源、氮源来生长, 具有高效的降解能力及研究价值。为阐明假单胞菌属微生物对尼古丁降解的特点及作用机制, 本文介绍了假单胞菌属降解尼古丁的菌株及特点, 分析了假单胞菌降解尼古丁的中间产物和代谢途径, 总结了假单胞菌降解尼古丁的相关基因, 最后对如何提高假单胞菌属降解尼古丁的能力等进行了展望, 以期为微生物降解尼古丁的研究与应用提供指导。

关键词: 尼古丁降解; 假单胞菌; 代谢产物; 生物转化途径

Research progress in nicotine degradation by *Pseudomonas*

WANG Kun^{1,2}, JIN Yinan³, LI Xiang², CAI Junlan², YU Hongxiao^{*1}, ZHANG Haoyang^{*1}, YUE Yong¹, ZHANG Donghai¹

1 China Tobacco Shandong Industrial Company with Limited Liability, Jinan 250104, Shandong, China

2 Beijing Life Science Academy, Beijing 102200, China

3 Nanjing Cigarette Factory, China Tobacco Jiangsu Industrial Company with Limited Liability, Nanjing 210012, Jiangsu, China

Abstract: Nicotine is the most abundant alkaloid in tobacco and causes serious harm to both the

资助项目: 山东中烟工业有限责任公司科技项目(110000097); 北京生命科技研究院重点科技项目(2023000CB0020)

This work was supported by the Science and Technology Project of China Tobacco Shandong Industrial Co., Ltd. (110000097), and the Key Science and Technology Project of Beijing Life Science Academy (2023000CB0020).

*Corresponding authors. E-mail: YU Hongxiao, hxyu@ustc.edu; ZHANG Haoyang, zhanghaoyang1211@163.com

Received: 2023-11-23; Accepted: 2024-03-09; Published online: 2024-04-12

environment and the human body. Microorganisms using nicotine as the energy source for growth can serve environmental remediation. *Pseudomonas* strains grow quickly and are highly adaptable to the environment. Moreover, they can grow with nicotine as the only carbon and nitrogen source, with excellent degradation performance and research potential. To elucidate the characteristics and mechanism of nicotine degradation by *Pseudomonas*, this paper introduced the strains and characteristics of *Pseudomonas* that can degrade nicotine, detailed the intermediates and pathways of nicotine degradation by *Pseudomonas*, and summarized the related genes. Finally, this paper prospected the ways to improve the ability of *Pseudomonas* in degrading nicotine, aiming to provide guidance for future research and applications of microbial degradation of nicotine.

Keywords: nicotine degradation; *Pseudomonas* sp.; metabolite; biotransformation pathway

尼古丁(nicotine)是烟草中最主要且含量最多的一种生物碱,与烟草的感官品质有着密切的关系^[1]。通常来讲,尼古丁是一种有毒的杂环化合物且不能回收利用。其在 60 °C 以下能与水以任意比例混合形成水合物,易通过淋溶作用污染土壤和地下水^[2]。目前,在卷烟的加工过程中产生的碎烟梗、碎烟末与污水等烟草废弃物中均含有较高浓度的尼古丁,危害较大。此外,尼古丁可以轻松地跨越生物膜和血脑屏障^[3],并对人体组织和细胞等造成损害。因此,1999年,欧盟首次将烟草废弃物列为“有毒和危险废弃物”^[4]。

生长在烟草根际的细菌群落可以将尼古丁作为生长的能量来源,它们能够通过生化途径降解这种有机杂环化合物^[5],例如假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) 41^[6]、凸形假单胞菌(*Pseudomonas convexa*) Pc1^[7]、氧化节杆菌(*Arthrobacter oxydans*)^[8]、嗜烟碱节杆菌(*Arthrobacter nicotinovorans*)^[9]和尼古丁无色杆菌(*Achromobacter nicotinophagum*)^[10],都具有降解尼古丁的能力。前人对节杆菌属(*Arthrobacter*)降解尼古丁的途径及相关代谢机制有着深入详细的阐述^[11],但是对假单胞菌属(*Pseudomonas*)降解尼古丁分子机制的总结却相对较少。

近年来,假单胞菌因在烟草制品的加工和处理烟草废弃物方面具有的独特作用而备受关注,同时,假单胞菌对尼古丁的生物转化研究也取得较大进展^[12-16]。本文对假单胞菌降解尼古丁的菌株、关键降解途径及降解相关基因进行综述,以期对微生物降解尼古丁的研究与应用提供指导。

1 假单胞菌属中的尼古丁降解菌

假单胞菌属(*Pseudomonas*)中许多菌株都能够降解尼古丁。最早关于假单胞菌属降解尼古丁的研究是在1954年,Wada等从土壤中分离出菌株41,研究发现该菌株在pH值为6.4、温度为30 °C的条件下能够有效降解尼古丁^[6]。此后关于假单胞菌降解尼古丁的研究则少之又少,直到20多年后,才有研究者报道了另一种尼古丁降解菌*Pseudomonas convexa* Pc1^[7]。近年来,越来越多的假单胞菌属的尼古丁降解菌株被报道。这些菌株降解尼古丁的最佳条件通常是温度为30 °C、pH 6.4–7.5(表1)。

假单胞菌属的多种尼古丁降解菌能够以尼古丁作为唯一的能量来源,并且部分假单胞菌属的菌株在尼古丁浓度高达4.0 g/L的环境下仍可生长,菌株*Pseudomonas* sp. ZUTSKD能在

表 1 假单胞菌属中能够降解尼古丁的菌株

Table 1 List of nicotine degrading strains of *Pseudomonas* sp.

菌株 Strain	降解尼古丁的最佳条件 Optimal conditions for the degradation of nicotine	年份 Year	参考文献 Reference
<i>Pseudomonas</i> sp. 41	尼古丁浓度 2.0 g/L, pH 6.4, 30 °C Nicotine concentration 2.0 g/L, pH 6.4, 30 °C	1954	[6]
<i>Pseudomonas convexa</i> Pc1	—	1978	[7]
<i>Pseudomonas</i> sp. HF-1	尼古丁浓度 1.3 g/L, pH 6.5–7.5, 30 °C Nicotine concentration 1.3 g/L, pH 6.5–7.5, 30 °C	2005	[17]
<i>Pseudomonas putida</i> S16	尼古丁浓度 3.0 g/L, pH 7.0, 30 °C Nicotine concentration 3.0 g/L, pH 7.0, 30 °C	2007	[18]
<i>Pseudomonas</i> sp. Nic22	尼古丁浓度 3.0 g/L, pH 6.5, 30–34 °C Nicotine concentration 3.0 g/L, pH 6.5, 30–34 °C	2008	[19]
<i>Pseudomonas putida</i> J5	尼古丁浓度 2.0 g/L, pH 7.0, 30 °C Nicotine concentration 2.0 g/L, pH 7.0, 30 °C	2009	[20]
<i>Pseudomonas</i> sp. ZUTSKD	尼古丁浓度 2.0 g/L, pH 7.5, 30 °C Nicotine concentration 2.0 g/L, pH 7.5, 30 °C	2008	[21]
<i>Pseudomonas</i> sp. CS3	尼古丁浓度 4.0 g/L, pH 7.0, 30 °C Nicotine concentration 4.0 g/L, pH 7.0, 30 °C	2012	[22]
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZCJ	尼古丁浓度 1.5 g/L, pH 7.4, 37 °C Nicotine concentration 1.5 g/L, pH 7.4, 37 °C	2012	[23]
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> TND35	尼古丁浓度 3.0 g/L, pH 7.0, 30 °C Nicotine concentration 3.0 g/L, pH 7.0, 30 °C	2014	[24]
<i>Pseudomonas geniculata</i> N1	尼古丁浓度 1.0 g/L, pH 6.5, 30 °C Nicotine concentration 1.0 g/L, pH 6.5, 30 °C	2014	[25]
<i>Pseudomonas</i> sp. HZN6	pH 7.0, 30 °C	2014	[26]
<i>Pseudomonas putida</i> JQ581	尼古丁浓度 1.0 g/L Nicotine concentration 1.0 g/L	2017	[27]
<i>Pseudomonas</i> sp. S-1	尼古丁浓度 0.4 g/L, pH 7.0, 30 °C Nicotine concentration 0.4 g/L, pH 7.0, 30 °C	2020	[28]
<i>Pseudomonas</i> sp. NBB	尼古丁浓度 1.0 g/L, 30 °C, 16 h Nicotine concentration 1.0 g/L, 30 °C, 16 h	2023	[29]

—: 未见报道

—: No report.

5.5 g/L 的超高尼古丁浓度下生长^[21], 并且能够在 48 h 内完全降解尼古丁。此外, Ruan 等观察到假单胞菌对尼古丁的降解率与菌株的生长速率呈正相关关系^[17], 这些可以降解烟草中尼古丁的假单胞菌在烟草加工中存在一定的潜在应用价值和发展前景。*Pseudomonas* sp. Nic22 是从烟叶中分离出来的菌株, 它能够分解不同品种、不同产地烟叶中的尼古丁, 包括美国的白肋烟、

中国的烤烟和津巴布韦的晾晒烟等; 菌株 Nic22 的粗酶提取物能够分解尼古丁且能显著提高烟叶的品质^[19]; Zhao 等通过液体淹没培养施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) ZCJ 产生菌悬液, 并应用于陈化发酵烟叶, 7 d 后烟叶中的尼古丁含量下降 32.24%, 在烟草工业中具有重要潜在应用价值^[23]。

通过对 *P. putida* 及其近缘菌株构建系统发

育树并进行聚类分析,结果表明,这些细菌聚集成两个类别(A、B)(图 1),可降解尼古丁的假单胞菌大多数聚集在 A 类中;假单胞菌属中的菌株如 ZB-16A、Dsp-1、S16、JQ581 和 J5 等均属于同一菌属,即恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) PFD11 也聚集在 A 类中,其可以将烟酸

(fat-soluble vitamin)分解为 2,5-二羟基吡啶(2,5-dihydroxypyridine),再进一步降解为马来酸(maleic acid)和甲酸(formic acid),这和 *P. putida* 降解尼古丁的途径类似^[30]。此外,聚集在 B 类的假单胞菌属,除弯曲假单胞菌(*Pseudomonas geniculata*) N1 外,其他菌属的假单胞菌少见有与尼古丁降解相关的报道。

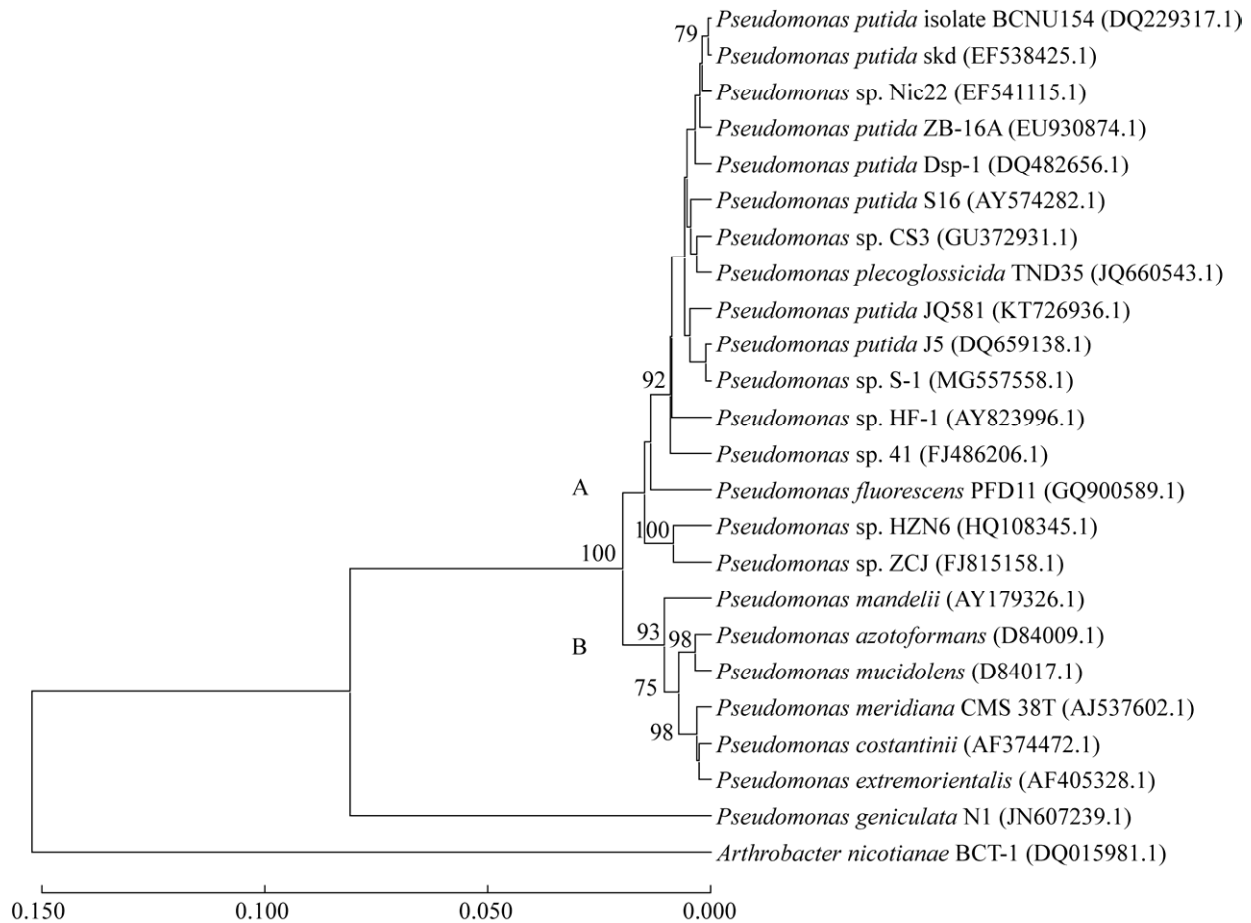


图 1 *Pseudomonas putida* 及其相关菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 多序列比对使用 MUSLE 算法,序列均来自 GenBank,对应 GenBank 登录号附于菌株名后;UPGMA 系统发育树的构建使用 MEGA 7.0 并执行 500 次自举检验,以检验系统发生树拓扑的置信度;标尺表示对应的分子遗传距离

Figure 1 Phylogenetic tree of *Pseudomonas putida* and its related strains based on 16S rRNA gene sequences. MUSLE algorithm was used for multiple sequences comparison. The sequences were all from GenBank, and the corresponding GenBank accession number was attached to the strain name. The UPGMA phylogenetic tree was constructed using the MEGA 7.0 and 500 bootstrap tests were performed to check the confidence of the phylogenetic tree topology. The ruler indicates the corresponding molecular genetic distance.

2 假单胞菌降解尼古丁的中间代谢产物和代谢途径

2.1 假单胞菌降解尼古丁的中间代谢产物

最早关于假单胞菌降解尼古丁的代谢途径研究是在 1942 年, Wenusch 从微生物对尼古丁的氧化过程中观察到有紫色的晶体物质在含有尼古丁和微生物的培养基中产生^[31]。随后, 相关学者做了大量关于微生物降解尼古丁的代谢途径的研究。1954 年, Wada 等首次提出尼古丁的代谢是从吡啶环的羟基化作用或吡咯烷的脱氢作用开始的, 同时检测到了 *N*-甲基麦斯明 (*N*-methylmysmine) 和假氧基尼古丁 (pseudooxynicotine) 两种代谢中间体, 并推测了尼古丁的代谢途径^[6]。1978 年, Thacker 等^[7]在菌株 *P. convexa* 代谢尼古丁的过程中发现了中间体假氧基尼古丁。2007 年, Wang 等从 *P. putida* S16 菌株降解尼古丁的过程中鉴定到了 3-琥珀酰吡啶(3-succinoyl-pyridine)、6-羟基-3-琥珀酰吡啶(6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine)、2,5-二羟基吡啶(2,5-dihydroxy pyridine)和马来酸(maleic acid)等代谢中间体^[18]。2014 年, Raman 等^[24]在研究菌株变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*) TND35 代谢尼古丁的过程中发现了除 *N*-甲基麦斯明之外的其他 4 种代谢中间体, 其中 4-羟基-1-(3 吡啶基)-1-丁酮[4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone]是烟草特有亚硝酸胺(tobacco specific nitrosamines, TSNA)的代谢产物, 这一发现为烟草有害成分相关研究提供了新的方向。同年, Liu 等^[25]在 *P. geniculata* N1 降解尼古丁过程中检测到了 6-羟基尼古丁(6-hydroxynicotine)、6-羟基-*N*-甲基麦斯明(6-hydroxy-*N*-methylmysmine)、6-羟基假氧基尼古丁(6-hydroxy-pseudooxynicotine)、2,6-二羟基假氧基尼古丁(2,6-dihydroxy-pseudooxynicotine)、可铁宁(cotinine)和麦斯明

(mysomine), 这与菌株 CS3^[22]的脱甲基降解途径类似。2014–2023 年大量关于假单胞菌降解尼古丁的代谢中间体相继被报道, 如 6-羟基尼古丁、可铁宁、氧化尼古丁(oxynicotine)、3-吡啶-*L*-甲基酮(3-pyridyl-*L*-methyl-ketone)^[32]、烟酸(fat-soluble vitamin)和 3-琥珀酰-吡啶-*N*-氧化物(3-succinoyl-pyridine-*N*-oxide)等^[33]。不同假单胞菌属中鉴定到的特有代谢产物^[6-7,17-29]见表 2。

随着微生物代谢尼古丁这一领域的研究热度逐渐增加, 相关研究人员筛选出一株尼古丁降解菌, 命名为 *P. putida* S16, 并根据核磁共振法(nuclear magnetic resonance, NMR)、傅里叶变换红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、紫外光谱法(ultraviolet spectroscopy, UVS), 气质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和高分辨率质谱法(high resolution mass spectrometry, HRMS)分析的结果, 确定了几种关键的代谢中间体, 并提出了菌株 *P. putida* S16 降解尼古丁的途径: 从尼古丁到 2,5-二羟基吡啶, 中间产物为 3-羟基丁酸(3-hydroxybutyric acid)、*N*-甲基麦斯明和琥珀酸, 该途径即是微生物代谢尼古丁的吡咯烷途径^[34]。此外, 还有研究发现了一种尼古丁代谢过程中的新产物: 4-羟基-1-(3 吡啶基)-1-丁酮[4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone]^[18]。另有研究发现了一株高效降解尼古丁的细菌 *P. sp.* HF-1 和几种以前从未报道过的中间体^[35], 如可铁宁、尼古提林和去甲基尼古丁^[36]。在 *P. sp.* Nic22^[19]和 *P. sp.* ZUTSKD^[21]降解尼古丁过程中也检测到类似的中间体。然而, 在菌株 HF-1 降解尼古丁过程中未检测到 *N*-甲基麦斯明, 却发现了 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶和 3-琥珀酰-吡啶这两种化合物, 这说明菌株 HF-1 的尼古丁代谢途径与其他假单胞菌属菌株有所不同^[35]。

表 2 不同假单胞菌中鉴定出的特有代谢产物

Table 2 Specific metabolite identified in different *Pseudomonas* sp.

菌株 Strain	特有代谢产物 Specific metabolite
<i>Pseudomonas</i> sp. 41 ^[6]	<i>N</i> -甲基麦斯明, 假氧基尼古丁 <i>N</i> -methylmyosmine, pseudooxynicotine
<i>Pseudomonas convexa</i> Pc1 ^[7]	假氧基尼古丁 Pseudooxynicotine
<i>Pseudomonas</i> sp. HF-1 ^[17]	尼古提林、去甲基尼古丁、环丙基(3-吡啶基)甲酮、可铁宁、麦斯明 Nicotyrine, nornicotine, cyclopropyl (3-pyridinyl) ketone, cotinine, mysomine
<i>Pseudomonas putida</i> S16 ^[18]	假氧基尼古丁、3-琥珀酰-吡啶、6-羟基-3-琥珀酰-吡啶、马来酸、琥珀酸、富马酸 Pseudooxynicotine, 3-succinoyl-pyridine, 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine, maleic acid, succinic acid, fumaric acid
<i>Pseudomonas</i> sp. Nic22 ^[19]	麦斯明、可铁宁、2,5-二羟基吡啶 Mysomine, cotinine, 2,5-dihydroxypyridine
<i>Pseudomonas putida</i> J5 ^[20]	3-琥珀酰-吡啶、假氧基尼古丁、3-琥珀酰半醛-吡啶 4-3-succinoyl-pyridine, pseudooxynicotine, 3-succinoyl semialdehyde-pyridine
<i>Pseudomonas</i> sp. ZUTSKD ^[21]	3-琥珀酰-吡啶、2,5-二羟基吡啶、可铁宁 3-succinoyl-pyridine, 2,5-dihydroxypyridine, cotinine
<i>Pseudomonas</i> sp. CS3 ^[22]	去甲基尼古丁、可铁宁 Nornicotine, cotinine
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZCJ ^[23]	6-羟基-3-琥珀酰-吡啶、2,5-二羟基吡啶 7-6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine, 2,5-dihydroxypyridine
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> TND35 ^[24]	<i>N</i> -甲基麦斯明、4-羟基-1-(3-吡啶基)-1-丁酮 <i>N</i> -methylmyosmine, 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone
<i>Pseudomonas geniculata</i> N1 ^[25]	麦斯明、可铁宁、6-羟基尼古丁、6-羟基- <i>N</i> -甲基麦斯明、6-羟基-假氧基尼古丁 Mysomine, cotinine, 6-hydroxynicotine, 6-hydroxy- <i>N</i> -methylmyosmine, 6-hydroxy-pseudooxynicotine
<i>Pseudomonas</i> sp. HZN6 ^[26]	假氧基尼古丁、3-琥珀酰-吡啶、6-羟基-3-琥珀酰-吡啶 Pseudooxynicotine, 3-succinoyl-pyridine, 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine
<i>Pseudomonas putida</i> JQ581 ^[27]	假氧基尼古丁、3-琥珀酰-吡啶 Pseudooxynicotine, 3-succinoyl-pyridine
<i>Pseudomonas</i> sp. S-1 ^[28]	可铁宁、3-琥珀酰-吡啶、6-羟基-3-琥珀酰-吡啶、2,5-二羟基吡啶 Cotinine, 3-succinoyl-pyridine, 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine, 2,5-dihydroxypyridine
<i>Pseudomonas</i> sp. NBB ^[29]	6-羟基尼古丁、 <i>N</i> -甲基麦斯明、2,5-二羟基吡啶、假氧基尼古丁、3-琥珀酰-吡啶、6-羟基-3-琥珀酰-吡啶 6-hydroxynicotine, <i>N</i> -methylmyosmine, 2,5-dihydroxypyridine, pseudooxynicotine, 3-succinoyl-pyridine, 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine

综上所述, 根据假单胞菌降解尼古丁的中间产物, 目前研究人员提出了 4 种可能的假单胞菌代谢尼古丁的途径: 吡啶途径、吡咯烷途径、吡啶和吡咯烷交叉途径及去甲基化途径。假单胞菌代谢尼古丁是复杂的过程, 仍须进行更加深入的研究探索。

2.2 假单胞菌降解尼古丁的代谢途径及与其他细菌的比较

已有大量的研究表明微生物中的尼古丁降解主要通过以下 4 种途径发生: 吡啶途径(在节杆菌中较为常见)^[10]、吡啶和吡咯烷交叉途径、吡咯烷途径(图 2 中提及的假单胞菌降解尼古丁的途

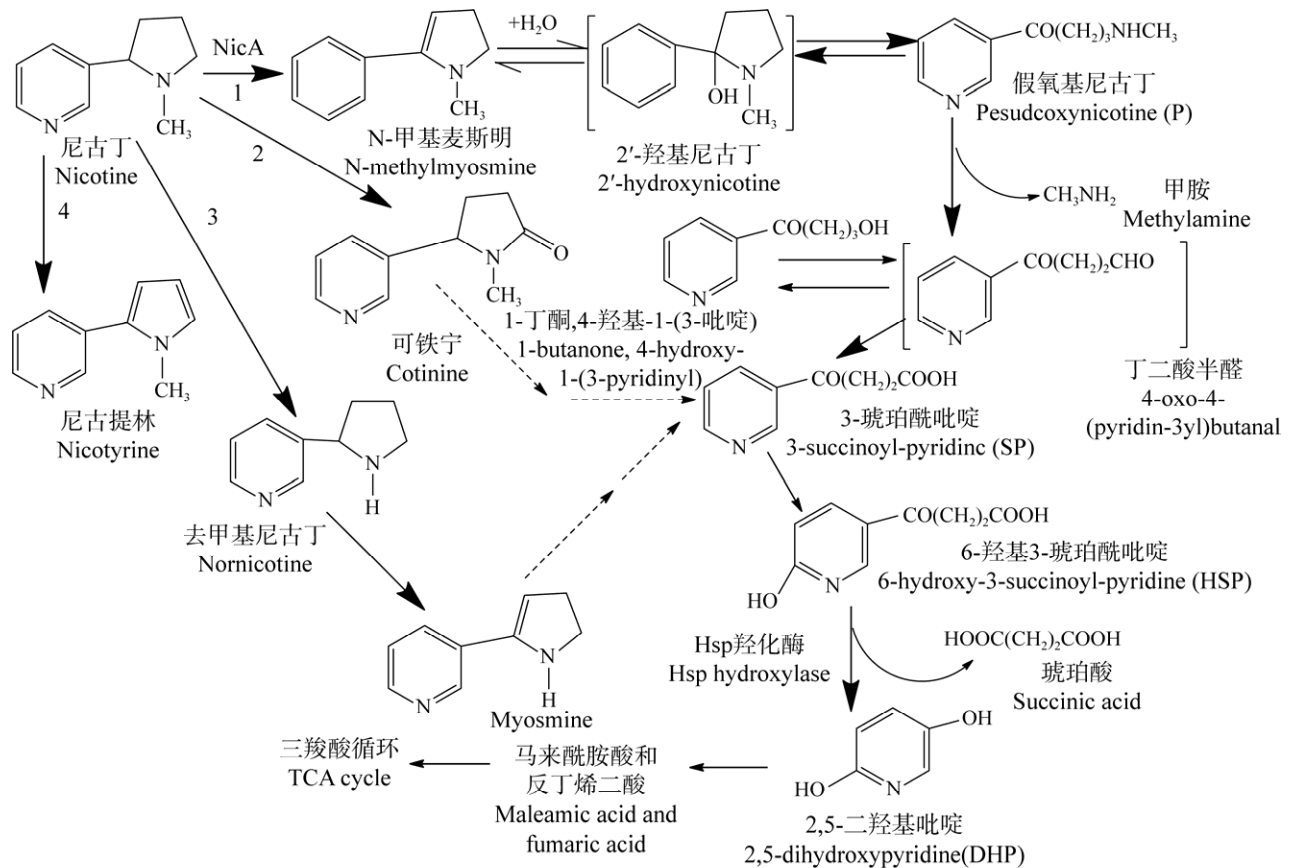


图 2 推测的假单胞菌降解尼古丁的途径 图中方括号内为未检测到的化合物 2'-羟基尼古丁和丁二酸半醛. 在 *Pseudomonas putida* S16 降解过程中发现了途径 1 (吡咯烷途径) 中的代谢化合物; 在 Nic22 和 HF-1 降解过程中发现了途径 2 和途径 3 的代谢化合物, 在 HF-1 降解过程中发现了途径 4 的代谢化合物
Figure 2 Speculates on the pathway of *Pseudomonas* sp. degradation of nicotine. The compound within square brackets in the figure are 2'-hydroxynicotine and 4-oxo-4-(pyridin-3-yl)butanal, which was not detected. Metabolic compounds in pathway 1 (pyrrolidine pathway) were found during the degradation of *Pseudomonas putida* S16. Metabolic compounds of pathway 2 and pathway 3 were found during the degradation of Nic22 and HF-1, and metabolic compounds of pathway 4 were found during the degradation of HF-1.

径)和去甲基化途径(在一些真菌和烟草植物中较为常见)^[5]。在菌株 HF-1、ZUTSKD 和 Nic22 等假单胞菌降解尼古丁的过程中, 发现了几种常见的代谢中间产物(如可铁宁、去甲基尼古丁和麦斯明), 这些产物与 *P. putida* S16 的吡咯烷途径中的代谢产物不同, 说明同样都是假单胞菌属菌株, 但有着不同的尼古丁降解途径^[37]。此外, 经过对比还发现在菌株 HF-1 的降解产物中也检测到了 3-琥珀酰-吡啶(3-succinoyl-

pyridine)和 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶(6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine)^[38], 这说明菌株 HF-1 的尼古丁降解途径可能有部分类似于 *P. putida* S16, 有部分与 *P. putida* S16 不同。

通过比较 *P. putida* S16 和 *A. nicotinevorans*^[10] 的尼古丁降解途径, 我们发现它们既无相同的中间产物, 也无相同的最终产物^[37]。在 *P. putida* S16 降解尼古丁的过程中, 尼古丁被尼古丁氧化还原酶 *nicA* 催化转化为 *N*-甲基麦

斯明, 然后 *N*-甲基麦斯明自发水解生成假氧基尼古丁(pseudooxynicotine), 假氧基尼古丁被 *nicA* 酶催化脱氢, 再经自然水解, 进一步转化为 3-琥珀酰-吡啶(3-succinoyl-pyridine), 随后 3-琥珀酰-吡啶的吡啶环羟基化, 将 3-琥珀酰-吡啶转化为 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶(6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine), 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶被 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶羟化酶直接催化成 2,5-二羟基吡啶(2,5-dihydroxypyridine), 2,5-二羟基吡啶的吡啶环裂开后转化为马来酰胺酸与反丁烯二酸, 最后一起进入三羧酸循环, 进行进一步的代谢^[39]。在 *A. nicotinovorans* 中不同的是, 尼古丁脱氢酶催化了尼古丁降解反应的初始过程, 将吡啶环羟基化为 6-羟基尼古丁(6-hydroxy-nicotine), 随后 6-羟基尼古丁通过一系列酶促反应被氧化、水解和羟基化^[40], 最后转换成 2,6-二羟基吡啶(2,6-dihydroxy pyridine) 和 γ -*N*-甲基氨基丁酸(γ -*N*-methyl-aminobutyric acid)^[41]。综上所述, *A. nicotinovorans* 和 *P. putida* S16 在尼古丁降解过程中的代谢途径及中间产物都不同。

3 假单胞菌降解尼古丁的相关基因

随着微生物代谢尼古丁的相关研究越来越多, 许多存在于尼古丁降解细菌质粒中的尼古丁降解相关基因已被发现^[42]。但是, 截至目前关于假单胞菌降解尼古丁的分子机制的信息报道较少。

1978 年, 相关研究者报道了菌株 Pc1 降解尼古丁的基因位于 NIC 质粒上^[7]。2015 年, Hu 等构建了 *P. putida* S16 菌株的基因组文库, 并筛选出了具有尼古丁降解能力的阳性克隆 GTPF, 它含有降解尼古丁的 *nic1* 基因簇, 能够将尼古丁转化为 *N*-甲基麦斯明、假氧基尼古丁、3-琥

珀酰-吡啶、6-羟基 3-琥珀酰-吡啶和 2,5-二羟基吡啶^[39]; 通过对 GTPF 进行亚克隆, 获得了编码 6-羟基 3-琥珀酰-吡啶羟化酶的基因 *hspA* 和 *hspB*, 该酶能够催化 6-羟基 3-琥珀酰-吡啶使其直接生成 2,5-二羟基吡啶, 因此 *hsp* 也是参与假单胞菌属降解尼古丁的关键基因^[39]。2019 年, 胡海洋解析了 *P. putida* S16 尼古丁吡咯代谢途径完整的转录调控机制, 发现了在 *P. putida* S16 中负责调控尼古丁代谢基因簇下游基因转录的 NicR2 蛋白, 通过 DNA 亲和纯化实验和质谱检测技术, 确认了 NicR2 参与了启动子 *Pspm* 的转录调控, 启动子 *Pspm* 负责控制的转录单元由 4 个基因构成(*spmA*、*spmB*、*spmC* 和 *mfs*), 位于 *nic2* 基因簇的中游; 该研究还发现 *P. putida* S16 代谢尼古丁的过程中, 假氧基尼古丁转化为 3-琥珀酰-吡啶的这一步, 是 *P. putida* S16 尼古丁代谢途径中的关键脱毒步骤, 而这一关键步骤被证明是一个假氧基尼古丁胺氧化酶(pseudooxynicotine amine oxidase, Pnao)在起作用, Pnao 蛋白对应的基因 *pnao* 是 *P. putida* S16 代谢尼古丁的关键基因^[43]。

Wang 等利用丝裂霉素处理的方法在菌株 HF-1 中鉴定出一种可以降解尼古丁的质粒并将其命名为 pMH1, 研究发现在 pMH1 质粒丢失的突变体菌株中, 菌株 HF-1 会丧失降解尼古丁的能力, 将 pMH1 转移到假单胞菌的远亲大肠杆菌中后, 大肠杆菌菌株也获得了尼古丁降解的能力, 并且在 pH 7.0 (大肠杆菌生长的最佳 pH 值)的条件下显示出较高的尼古丁降解效率^[35]。同时, 有研究进一步发现参与尼古丁降解的 *hsp* 基因位于 pMH1 上, pMH1 质粒是一种新型的尼古丁降解质粒^[44]。Yu 等通过自成形接头 PCR (self-formed adaptor PCR, SEFA-PCR)技术完成了质粒 pMH1 的全序列测定, 其大小为 23 315 bp, 并且可在环境中持久稳定存在; 采用生物信息

学的方法对其进行序列分析和功能预测,发现该质粒上不仅含有催化 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶转化为 2,5-二羟基吡啶的 *hsp* 基因,还含有催化假氧基尼古丁生成 3-琥珀酰-吡啶和甲胺的 *amo* 基因^[34]。

Xia 等从烟草根际中分离出一种能有效降解尼古丁的菌株 *P. putida* J5, 通过 Tn5 转座子诱变技术对尼古丁代谢相关基因进行全基因组分析,发现 Tn5 转座子插入 *P. putida* J5 的酮戊酸羟甲基转移酶基因(*panB*)位点^[20]; 该菌株的 *panB* 基因与菌株 *E. coli* K-12 的相似性为 54%, 同时敲除 *panB* 基因会使 *P. putida* J5 失去降解尼古丁的能力, 而 *E. coli* K-12 的 *panB* 基因的回补使突变体的降解活性恢复到野生型水平, 结果表明 *panB* 是 *P. putida* J5 代谢尼古丁的关键基因^[20]。

Qiu 等研究筛选出一株尼古丁高效降解菌株 HZN6, 并研究其降解途径和降解机制, 通过转座子诱变方法构建了尼古丁降解失活的突变株文库, 筛选到 229 个突变株, 对突变株降解性能进行研究, 发现突变株 N6m1 中 *orfC* 基因被插入突变, 该基因编码一种硫转移酶同源蛋白 SirA2, 通过基因的敲除与功能回补, 确认 *orfC* 基因与 3-琥珀酰-吡啶的降解相关^[45]; 另一突变株 N6mC8 为假氧基尼古丁降解能力失活突变, 利用 SEFA-PCR 方法扩增, 发现其中包含 *pao* 和 *sap* 两个基因, 其中 *pao* 基因编码假氧基尼古丁胺氧化酶, 催化假氧基尼古丁生成 3-琥珀酸半醛-吡啶; *sap* 基因编码 3-琥珀酸半醛吡啶脱氢酶, 催化 3-琥珀酸半醛-吡啶脱氢生成 3-琥珀酰-吡啶^[46]。

4 展望

目前, 我国烟草种植和卷烟制作过程中产生了大量烟草废弃物和含尼古丁的工业废水,

对环境具有高危害性, 可能导致严重污染^[47]。假单胞菌是尼古丁降解的优势菌群, 能够耐受高浓度的尼古丁, 并能够利用尼古丁作为唯一的碳源和氮源进行生长, 可以有效降低尼古丁对人体和生态环境的危害, 减轻尼古丁造成的环境污染^[48]。此外, 在卷烟配方设计过程中, 上部烟叶尼古丁含量较高, 导致可用性较低, 而假单胞菌可以降解库存烟叶中的尼古丁、蛋白质和亚硝胺等物质, 从而可以减少烟叶在仓库中的陈化发酵时间, 在不破坏烟叶抽吸品质和特性的同时改善烟叶的内在品质, 显著提高上部烟叶资源的利用率^[49]。

假单胞菌代谢尼古丁的过程较为复杂, 本文综述了假单胞菌属中的尼古丁降解菌株、假单胞菌降解尼古丁的中间代谢产物和代谢途径, 以及假单胞菌降解尼古丁的相关基因, 阐述了假单胞菌降解尼古丁的 4 种可能的分解代谢途径。此外, 在假单胞菌降解尼古丁的过程中产生的代谢产物具有生物利用价值, 如 *P. putida* S16 等假单胞菌属菌株可以将尼古丁转化为 6-羟基-3-琥珀酰-吡啶和 2,5-二羟基吡啶, 它们是合成药物及杀虫剂的重要前体物质, 并且不需要复杂的分离步骤即可获得, 这种生物转化为烟草废弃物中尼古丁的资源化利用提供了一个新的方向^[50]。

虽然假单胞菌多样的降解机制为卷烟的加工制造和烟草废弃物污染的处理提供了丰富的资源和多样化的选择, 但因假单胞菌降解尼古丁的机制较为复杂, 大多数菌株的降解方式和降解机制尚不清晰, 降解过程中的关键酶和基因尚未被完全解析, 因此, 目前这项技术还未有效地应用于实践中, 这也将成为日后研究人员重点关注的领域。随着基因组学与蛋白质组学的不断发展, 今后可以通过在菌株中利用导入重金属抗逆元件、耐盐元件、耐热元件等基因编辑和修饰的方法, 不断优化并提高启动子

活性；或将原有启动子进行替换，提高菌株尼古丁代谢相关基因的表达水平，从而提高降解尼古丁的能力；通过探索合适的尼古丁代谢酶制剂施用时间和施用方法，加快假单胞菌降解尼古丁从基础研究向实践应用的转化，以期与实际生产及生态环境保护提供更好的技术支持。

REFERENCES

- [1] 赵凡冲, 张豪洋, 贾玮, 黄五星, 韩丹, 许自成, 党炳俊. 尼古丁降解菌株 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).
- [2] 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).
- [3] 董佳丽. 慢性尼古丁暴露调控 miR-21/Pdlim5 减轻急性脑缺血血脑屏障损伤[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2020. DONG JL. Chronic nicotine exposure alleviates acute ischemia-induced blood-brain barrier damage through regulating of miR-21/Pdlim5[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2020 (in Chinese).
- [4] NOVOTNY TE, ZHAO F. Consumption and production waste: another externality of tobacco use[J]. Tobacco Control, 1999, 8(1): 75-80.
- [5] WILKES RA, ARISTILDE L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 582-593.
- [6] WADA E, YAMASAKI K. Degradation of nicotine by soil Bacteria[J]. Journal of the American Chemical Society, 1954, 76(1): 155-157.
- [7] THACKER R, RØRVIG O, KAHN P, GUNSALUS IC. NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*[J]. Journal of Bacteriology, 1978, 135(1): 289-290.
- [8] SCHWABE R, DITTRICH C, KADNER J, SENGE CHR, BANDOW JE, TISCHLER D, SCHLÖMANN M, LEVICAN G, WICHE O. Secondary metabolites released by the rhizosphere bacteria *Arthrobacter oxydans* and *Kocuria rosea* enhance plant availability and soil-plant transfer of germanium (Ge) and rare earth elements (REEs)[J]. Chemosphere, 2021, 285: 131466.
- [9] 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.
- [10] SCHENK S, HOELZ A, KRAUSS B, DECKER K. Gene structures and properties of enzymes of the plasmid-encoded nicotine catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans*[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 284(5): 1323-1339.
- [11] ZHANG ZL, MEI XT, HE ZL, XIE XY, YANG Y, MEI CY, XUE D, HU T, SHU M, ZHONG WH. Nicotine metabolism pathway in bacteria: mechanism, modification, and application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(3): 889-904.
- [12] LI J, WANG J, LI SS, YI FM, XU J, SHU M, SHEN MJ, JIAO Y, TAO F, ZHU CY, ZHANG H, QIAN SL, ZHONG WH. Co-occurrence of functional modules derived from nicotine-degrading gene clusters confers additive effects in *Pseudomonas* sp. JY-Q[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(11): 4499-4510.
- [13] HUANG HY, SHANG JM, WANG SN. Physiology of a hybrid pathway for nicotine catabolism in bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 598207.
- [14] HUANG HY, YU WJ, WANG RS, LI HL, XIE HJ, WANG SN. Genomic and transcriptomic analyses of *Agrobacterium tumefaciens* S33 reveal the molecular mechanism of a novel hybrid nicotine-degrading pathway[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4813.
- [15] DEAY DO 3rd, SEIBOLD S, BATTAILLE KP, LOVELL S, RICHTER ML, PETILLO PA. Improving the kinetic parameters of nicotine oxidizing enzymes by homologous structure comparison and rational design[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2022, 718: 109122.
- [16] HUANG CC, SHAN LH, CHEN ZY, HE ZL, LI J, YANG Y, SHU M, PAN FD, JIAO Y, ZHANG FM, LINHARDT RJ, ZHONG WH. Differential effects of homologous transcriptional regulators NicR2A, NicR2B1, and NicR2B2 and endogenous ectopic strong promoters on nicotine metabolism in *Pseudomonas* sp. strain JY-Q[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(3): e02457-20.

- [17] RUAN AD, MIN H, PENG XH, HUANG Z. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine[J]. *Research in Microbiology*, 2005, 156(5/6): 700-706.
- [18] WANG SN, LIU Z, TANG HZ, MENG J, XU P. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16[J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 5): 1556-1565.
- [19] CHEN CM, LI XM, YANG JK, GONG XW, LI B, ZHANG KQ. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(3): 226-231.
- [20] XIA ZY, ZHANG W, LEI LP, LIU XZ, WEI HL. Genome-wide investigation of the genes involved in nicotine metabolism in *Pseudomonas putida* J5 by Tn5 transposon mutagenesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(15): 6503-6514.
- [21] 孙柯丹. 尼古丁高效降解菌 *Pseudomonas* sp. ZUTSKD 的分离鉴定及降解特性和代谢途径的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2008.
- SUN KD. Isolation and characterization of a high nicotine-degrading bacterium, *Pseudomonas* sp. ZUTSKD[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2008 (in Chinese).
- [22] 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.
- [23] ZHAO L, ZHU CJ, GAO Y, WANG C, LI XZ, SHU M, SHI YP, ZHONG WH. Nicotine degradation enhancement by *Pseudomonas stutzeri* ZCJ during aging process of tobacco leaves[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(5): 2077-2086.
- [24] RAMAN G, MOHAN K, MANOHAR V, SAKTHIVEL N. Biodegradation of nicotine by a novel nicotine-degrading bacterium, *Pseudomonas plecoglossicida* TND35 and its new biotransformation intermediates[J]. *Biodegradation*, 2014, 25(1): 95-107.
- [25] LIU YH, WANG LJ, HUANG KM, WANG WW, NIE XL, JIANG Y, LI PP, LIU SS, XU P, TANG HZ. Physiological and biochemical characterization of a novel nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas geniculata* N1[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84399.
- [26] 邱吉国. 假单胞菌降解尼古丁的分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2014.
- QIU JG. The molecular catabolic mechanism of nicotine by *Pseudomonas* sp. HZN6[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
- [27] 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.
- [28] 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: 安徽农业大学硕士学位论文, 2019.
- SUN MM. Isolation, identification and degradation of a nicotine-degrading strain[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [29] XU ZY, ZHANG TT, HU HY, LIU WZ, XU P, TANG HZ. Characterization on nicotine degradation and research on heavy metal resistance of a strain *Pseudomonas* sp. NBB[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 459: 132145.
- [30] 陈辰. 一株新的高效尼古丁降解菌的分离鉴定、降解条件优化及代谢机制研究[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2019.
- CHEN C. Screening, isolation, identification and characteristics of a new nicotine degrading strain, optimization of degradation conditions and elucidation of the catabolic mechanism[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2019 (in Chinese).
- [31] WENUSCH A. Further study of a biological decomposition of nicotine[J]. *Ztechr Untersuch Lebensmitt*, 1942, 84: 498-501.
- [32] FITZPATRICK PF. The enzymes of microbial nicotine metabolism[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2018, 14: 2295-2307.
- [33] CHANG XH, WANG Y, SUN JG, XIANG HB, YANG Y, CHEN SW, YU J, YANG CL. Mitigation of tobacco bacteria wilt with microbial degradation of phenolic allelochemicals[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 20716.
- [34] YU H, HAUSINGER RP, TANG HZ, XU P. Mechanism of the 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine 3-monooxygenase flavoprotein from *Pseudomonas putida* S16[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(42): 29158-29170.
- [35] WANG MZ, YANG GQ, MIN H, LV ZM. A novel nicotine catabolic plasmid pMH1 in *Pseudomonas* sp. strain HF-1[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(3): 228-233.
- [36] 孙骏. 假单胞菌中 CRISPR 基因编辑系统的建立与应用[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2020.
- SUN J. Establishment and application of CRISPR genome editing systems in *Pseudomonas*[D]. Hangzhou: Doctoral

- Dissertation of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [37] TANG HZ, WANG LJ, MENG XZ, MA LY, WANG SN, HE XF, WU G, XU P. Novel nicotine oxidoreductase-encoding gene involved in nicotine degradation by *Pseudomonas putida* strain S16[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(3): 772-778.
- [38] WANG X, TANG L, YAO YL, WANG HX, MIN H, LU ZM. Bioremediation of the tobacco waste-contaminated soil by *Pseudomonas* sp. HF-1: nicotine degradation and microbial community analysis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(13): 6077-6088.
- [39] HU HY, WANG WW, TANG HZ, XU P. Characterization of pseudooxynicotine amine oxidase of *Pseudomonas putida* S16 that is crucial for nicotine degradation[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17770.
- [40] DEAY DO 3rd, COLVERT KK, GAO F, SEIBOLD S, GOYAL P, AILLON D, PETILLO PA, RICHTER ML. An active site mutation in 6-hydroxy-L-Nicotine oxidase from *Arthrobacter nicotinovorans* changes the substrate specificity in favor of (S)-nicotine[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2020, 692: 108520.
- [41] 张豪洋, 党炳俊, 金伊楠, 李子玮, 孙燕鑫, 郭笑恒, 许自成. 烟草废弃物中尼古丁生物调控的研究进展[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(6): 772-778.
- ZHANG HY, DANG BJ, JIN YN, LI ZW, SUN YX, GUO XH, XU ZC. Research progress on biological regulation of nicotine in tobacco waste[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(6): 772-778 (in Chinese).
- [42] 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: 河南农业大学硕士学位论文, 2021.
- ZHANG HY. Study on the screening, identification and degradation characteristics of the nicotine-degrading bacteria *Agrobacterium tumefaciens* LN-1[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [43] 胡海洋. 恶臭假单胞菌 S16 尼古丁吡咯代谢分子机理研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2019.
- HU HY. Molecular mechanism of pyrrolidine pathway of nicotine degradation by *Pseudomonas putida* S16[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [44] MIHÅŞAN M, BABII C, ASLEBAGH R, CHANNAVEERAPPA D, DUPREE EJ, DARIE CC. Exploration of nicotine metabolism in *Paenarthrobacter nicotinovorans* PAO1 by microbial proteomics[M]// Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research. Cham: Springer, 2019: 515-529.
- [45] QIU JG, MA Y, CHEN LS, WU LF, WEN YZ, LIU WP. A sirA-like gene, sirA2, is essential for 3-succinoylpyridine metabolism in the newly isolated nicotine-degrading *Pseudomonas* sp. HZN6 strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(5): 1023-1032.
- [46] WEI HL, LEI LP, LIU S, XIA ZY, LIU XZ, LIU PG. PanB is involved in nicotine metabolism in *Pseudomonas putida*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(8): 988-992.
- [47] 李永赞, 曾宗梁, 杨军伟, 李广煜, 辜运富. 烤烟根际尼古丁降解细菌的多样性及其促生特性分析[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3632-3641.
- LI YY, ZENG ZL, YANG JW, LI G Y GU YF. Analysis on the diversity and plant growth-promoting characteristics of bacteria in rhizosphere of flue-cured tobacco[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3632-3641 (in Chinese).
- [48] 郑亚东. 假单胞菌 ZZ-5 降解尼古丁吡咯降解途径关键酶研究[D]. 郑州: 郑州轻工业大学硕士学位论文, 2019.
- ZHENG YD. Study on key enzymes of pyrrolidine pathway degrading nicotine by *Pseudomonas* ZZ-5[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University of Light Industry, 2019 (in Chinese).
- [49] HU HY, WANG LJ, WANG WW, WU G, TAO F, XU P, DENG ZX, TANG HZ. Regulatory mechanism of nicotine degradation in *Pseudomonas putida*[J]. mBio, 2019, 10(3): e00602-e00619.
- [50] 王丽娟. 恶臭假单胞菌 S16 分解代谢尼古丁分子机理研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2014.
- WANG LJ. Molecular Mechanism of Nicotine Catabolism by *Pseudomonas putida* S16[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2014 (in Chinese).