

光合细菌耐铵突变株的构建与产氢特性研究

高子璇, 曹稳, 魏雯雯, 郭烈锦

(西安交通大学动力工程多相流国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 为了缓解铵离子(NH_4^+)对光发酵制氢的抑制作用,以荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*, *R. capsulatus*) SB1003 为研究对象,通过基因工程构建耐铵突变株并评估其产氢性能。首先,采用重叠延伸聚合酶链式反应(SOE PCR)对固氮调控基因(*nifA*)进行改造,获得 *nifA1* N 端缺失突变株 ZX01、*nifA2* N 端缺失突变株 ZX02 及双缺失突变株 ZX03。然后,将上述菌株接种于以葡萄糖为碳源、不同浓度硫酸铵和谷氨酸钠为混合氮源的产氢液中,在光照、厌氧条件下进行光发酵产氢。通过实验比较不同突变株在含铵和无铵条件下的产氢性能及相关基因表达水平,结果表明,在铵态氮质量分数为 20% 时, ZX03 的累计产氢量最高为 $(801.80 \pm 60.40) \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,较野生型提高 22.7%。Gompertz 动力学拟合表明, ZX01 的产氢迟滞期最短为 $(7.99 \pm 3.41) \text{ h}$,表明其产氢启动更快。实时定量聚合酶链式反应 PCR(qPCR)分析结果表明,在高铵条件(NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下, ZX03 中氮信号转导蛋白编码基因 *glnB1* 和 *glnB2* 的转录水平较野生型上调 220 倍,电子传递相关基因 *rnfB* 及黄素氧化还原蛋白编码基因 *fldA* 的表达亦显著增强。研究结果表明, *nifA1* N 端缺失缩短产氢迟滞期, *nifA2* N 端缺失提升基础产氢能力;双缺失株耐铵性最优,且上调氮信号与电子传递相关基因表达,从而在高铵条件下实现最优产氢。该研究可为构建耐铵高效光发酵产氢工程菌株提供明确的分子改造策略与理论依据。

关键词: 光发酵制氢;光合细菌;突变株;光发酵;产氢;基因编辑

中图分类号: TK91 **文献标志码:** A

DOI: 10.7652/xjtuxb202608008 **文章编号:** 0253-987X(2026)08-0091-11

Construction and Hydrogen Production Characterization of Ammonium-Tolerant Photosynthetic Bacterial Mutants

GAO Zixuan, CAO Wen, WEI Wenwen, GUO Liejin

(State Key Laboratory of Multiphase Flow in Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: To alleviate the inhibitory effect of ammonium ions (NH_4^+) on photo-fermentative hydrogen production, *Rhodobacter capsulatus* SB1003 was selected as the model organism. Ammonium-tolerant mutant strains were constructed via genetic engineering, and their hydrogen production performance was evaluated. The nitrogen fixation regulatory gene (*nifA*) was modified using overlap extension PCR (SOE-PCR), generating three engineered strains: the *nifA1* N-terminal deletion mutant ZX01, the *nifA2* N-terminal deletion mutant ZX02, and the double-deletion mutant ZX03. These strains were inoculated into a hydrogen production medium with glucose as the carbon source and with different concentrations of ammonium sulfate and sodium glutamate as mixed nitrogen sources,

收稿日期: 2026-01-27。 作者简介: 高子璇(1997—),女,博士生;曹稳(通信作者),男,副研究员,硕士生导师。 基金

项目: 国家自然科学基金资助项目(52488201)。

网络出版时间: 2026-04-16

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/61.1069.T.20260416.1610.005>

and were cultivated under anaerobic and illuminated conditions for photo-fermentative hydrogen production. The hydrogen production performance, lag phase characteristics, and related gene expression profiles were comparatively analyzed under both ammonium-containing and ammonium-free conditions. The results show that at an ammonium nitrogen mass fraction of 20%, ZX03 achieves the highest cumulative hydrogen production of $(801.80 \pm 60.40) \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, representing a 22.7% increase compared with the wild-type strain. Gompertz kinetic modeling further shows that ZX01 exhibits the shortest lag phase $(7.99 \pm 3.41) \text{ h}$, indicating significantly accelerated initiation of hydrogen production. Quantitative real-time polymerase chain reaction PCR (qPCR) analysis reveals that under high ammonium conditions (NH_4^+ concentration of $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), the transcription levels of nitrogen signal transduction genes (*glnB1* and *glnB2*) in ZX03 are upregulated by approximately 220-fold relative to the wild type. In addition, genes associated with electron transport, including *mfB*, and the flavodoxin-encoding gene *fldA*, are also markedly upregulated, indicating enhanced metabolic electron flux. Overall, these findings demonstrate that N-terminal deletion of *nifA1* primarily shortens the hydrogen production lag phase, whereas *nifA2* N-terminal deletion enhances basal hydrogen production capability. Notably, the double-deletion mutant ZX03 exhibits the strongest ammonium tolerance and optimal hydrogen production performance under high ammonium stress by simultaneously upregulating nitrogen signaling and electron transport-related genes. This study provides a clear and effective molecular engineering strategy, as well as a theoretical foundation, for the development of robust, ammonium-tolerant, high-efficiency photo-fermentative hydrogen-producing strains.

Keywords: photo-fermentative hydrogen production; photosynthetic bacteria; mutant; photo-fermentation; hydrogen production; gene editing

近几十年来,随着全球经济的快速发展,化石能源被大量消耗,引发了资源紧缺、环境污染和气候变化等一系列全球性问题^[1]。人类社会在能源供应和生态安全方面面临双重压力,这迫切推动了对可再生能源的需求。在诸多新能源中,氢能因其能量密度高、燃烧产物清洁、来源多样等优势,被广泛认为是最具发展潜力的替代能源之一^[2-3]。目前,氢气生产主要依赖化石燃料,不仅消耗不可再生资源,还会产生大量温室气体,对生态环境造成负面影响。相比之下,生物制氢技术因可利用可再生生物质作为原料而更具可持续性,其主要形式包括暗发酵制氢、光发酵制氢和暗-光联合制氢^[4]。其中,暗发酵的底物转化率偏低,暗-光联合工艺较为复杂,而光发酵制氢能够在处理有机废弃物的同时高效产生氢气,具有底物适应性强、操作简便等优势,被认为是未来极具潜力的氢能生产途径。

光合细菌的产氢主要依赖固氮酶的催化作用,而该酶对环境中的铵浓度极为敏感,高浓度铵会显著甚至完全抑制固氮酶活性,因此光合产氢通常需在无氧、有光且低铵的条件下进行^[5]。在产氢培养中,氮源常以谷氨酸钠、酵母膏等有机氮替代铵盐,以减

轻铵的抑制效应。当培养基中存在铵时,固氮酶会发生腺苷二磷酸(Adenosine Diphosphate, ADP)核糖基化,导致产氢活性下降;该抑制作用虽然可逆,但其存在严重限制了光合产氢效率^[6]。尤其是在利用暗发酵废液或有机废水作为底物时,其中普遍含有较高浓度的铵态氮,直接限制了光合细菌的产氢速率和应用潜力。因此,若能削弱铵态氮对固氮酶的抑制效应,将显著提升光合产氢效率并降低工业化成本。

近年来,分子层面的基因工程调控已被证明是增强耐铵性的有效策略。已有研究表明,通过调控氮信号通路能有效缓解铵抑制,例如 Drepper^[7]等构建氮信号转导蛋白编码基因 *glnB* 与 *glnK* 双缺失突变株后,当铵浓度为 $200 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,突变株的固氮酶乙炔还原活性为野生型的 4 倍,产氢量提高 1.5 倍,显示了破坏 PII 蛋白介导的氮调控可显著提升耐铵与产氢性能。除信号传导外,直接调控固氮关键转录激活因子 *nifA* 蛋白也成为缓解铵抑制的另一重要途径。*nifA* 蛋白的 N 端结构域能够感知细胞内的铵状态,并参与铵依赖性翻译后调控。已有研究证实,在草螺菌属细菌

(*Herbaspirillum seropedicae*)中,缺失 N 端结构域的 *nifA* 蛋白在含铵条件下仍保持活性,表明 N 端结构域在铵抑制机制中的关键作用^[8]。

值得注意的是,荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*, *R. capsulatus*)中存在两份高度同源的固氮调控基因 *nifA* (*nifA1* 和 *nifA2*),分别编码 582 个和 579 个氨基酸,其差异仅在于 N 端结构域的 22 个(66 个碱基对)或 19 个(57 个碱基对)氨基酸不同。然而,这些微小的 N 端差异是否会导致两者在铵调控中的功能分化尚不清楚,这一问题关系到光合细菌耐铵机制的精细调控。基于此,有必要通过构建 *nifA1*、*nifA2* N 端缺失突变株,系统阐明两份 *nifA* 在铵依赖调控中的具体生物学功能,为通过基因工程提升光合产氢性能提供理论支撑。因此,本研究利用重叠延伸聚合酶链式反应(SOE PCR)技术构建了 *nifA* N 端缺失耐铵突变株,并在高铵条件下分析其产氢性能、底物利用率和相关基因表达水平,以期揭示光合细菌铵调控机制及提升光合产氢效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细菌与培养基

本文研究所用到的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、质粒载体、光合细菌模型菌株、引物以及相关载体的抗性等基本特征和来源如表 1 所示。*R. capsulatus* SB1003 及其突变株培养于 MedA 培养基^[9]中。大肠杆菌菌株采用 Luria-Bertani (LB)培养基进行培养。在预培养过程中,将 *R. capsulatus* 菌株接种于 10 mL MedA 液体培养基中,在 50 mL 螺口离心管内于 35 ℃ 下培养;大肠杆菌菌株则接种于 10 mL LB 液体培养基,在温度为 37 ℃、转速为 180 r·min⁻¹ 条件下培养。所有离心管均在黑暗条件下以转速为 180 r·min⁻¹ 进行振荡有氧培养。根据质粒携带的抗性标记,每升培养基中分别加入质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的氨苄青霉素 10 mL、质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的卡那霉素 10 mL、质量浓度为 1.25 mg·mL⁻¹ 的四环素 10 mL 或质量浓度为 6 mg·mL⁻¹ 的庆大霉素 2 mL,用于大肠杆菌的筛选。

表 1 本文所用的菌株、质粒及引物

Table 1 Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

菌株、质粒及引物	编号	相关特征	来源
<i>R. capsulatus</i>	SB1003	野生型, Rif ^r	文献[10]
	ZX01	基于 SB1003 的 <i>nifA1</i> 基因缺失突变株	文献[11]
	ZX02	基于 SB1003 的 <i>nifA2</i> 基因缺失突变株	本文
	ZX03	基于 SB1003 的 <i>nifA</i> 基因双缺失突变株	本文
<i>E. coli</i>	XL1-blue	Spec ^r	Stratagene 公司
	S17-1	Tet ^r	文献[12]
	pRK2013/HB101	三亲本杂交中的助细胞, Kan ^r	文献[13]
质粒	pBlu2SKP	Amp ^r	Stratagene 公司
	pBS <i>nifA2</i>	Amp ^r , 携带有 <i>nifA2</i> 基因的 pBS2SKP 质粒	本文
	pZJD29C	Gen ^r , 自杀质粒	文献[14]
	pZ <i>nifA2</i>	Gen ^r , 携带有 <i>nifA2</i> 缺失基因的自杀质粒	本文
引物	RT16S-F	CGCGCAGAACCTTACCAACC	本文
	RT16S-R	CGCTCGTTGCCGACTTAAC	本文
	RT <i>glnB1</i> -F	CTTCCTGCCCAAGGTGAAGAT	本文
	RT <i>glnB1</i> -R	TGTTTCGATGGAGGAGACGAAG	本文
	RT <i>glnB2</i> -F	TTCAAGCTTCACCTTCGGCA	本文
	RT <i>glnB2</i> -R	CATTGCAGCGATCAAACCGT	本文
	RT <i>trnB</i> -F	AGCAGATCCATACCGTGGTG	本文
	RT <i>trnB</i> -R	CTTGAGGGTCTTCGGCTTGA	本文
	RT <i>fldA</i> -F	GCAGATCCATACCGTGGTGATG	本文
	RT <i>fldA</i> -R	GTCTTGAGGGTCTTCGGCTTGA	本文

注: Rif^r 为利福平抗性; Spec^r 为壮观霉素抗性; Tet^r 为四环素抗性; Kan^r 为卡那霉素抗性; Amp^r 为氨苄青霉素抗性; Gen^r 为庆大霉素抗性; DNA 序列中 A 表示腺嘌呤, T 表示胸腺嘧啶, G 表示鸟嘌呤, C 表示胞嘧啶。

1.2 质粒与突变株的构建

突变株的构建流程如图 1(a) 所示。本研究采

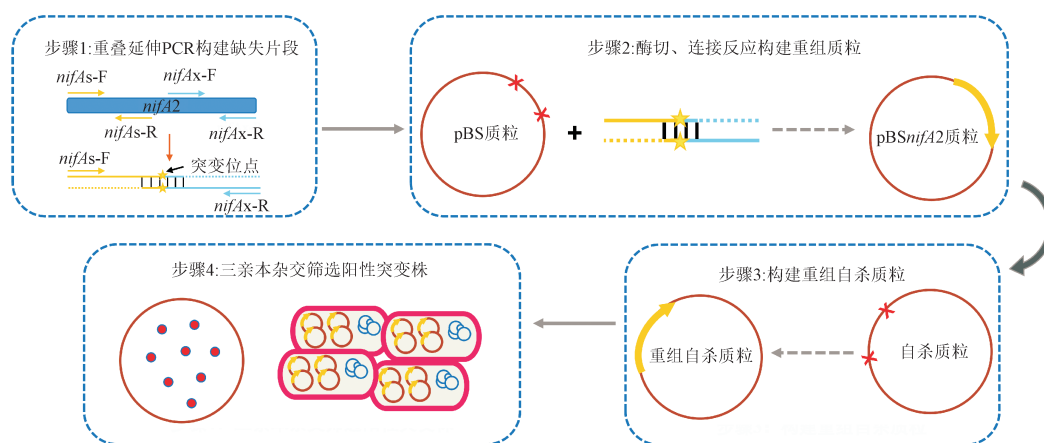
用 SOE PCR 技术与巢式 PCR 技术构建了携带 *nifA2* 基因 N 端缺失片段的产物, 具体方法参照文

献[15]。首先,以 *R. capsulatus* SB1003 基因组 DNA 为模板,设计 2 对特异性引物分别扩增 *nifA2* 基因 N 端缺失位点的上游同源臂和下游同源臂。其中,上游同源臂的下游引物与下游同源臂的上游引物引入互补重叠序列(约 20~25 个碱基对),使 2 个扩增片段末端带有重叠区域。然后,以纯化后的上游和下游同源臂扩增产物为模板,采用外侧引物进行第 2 轮扩增反应,通过重叠链的退火延伸将 2 个片段拼接为含有 *nifA2* N 端精确缺失的融合片段。随后,将该融合片段克隆至克隆载体 pBlu2SKP 中,构建重组质粒 pBS*nifA2*。经测序验证序列无误后,利用 KpnI 和 XbaI 限制性内切酶位点将 *nifA2* N 端缺失片段从 pBS*nifA2* 酶切后亚克隆至经同样酶切处理的自杀质粒 pZJD29C 中,构建重组自杀质粒 pZ*nifA2*。以 pRK2013 为辅助质粒,通过三亲本杂交将 pZ*nifA2* 由大肠杆菌 S17-1 供体菌株转移至 *R. capsulatus* SB1003 受体菌株。将菌液涂布于含庆大霉素的固体平板上,筛选发生第 1 次同源重组、整合有自杀质粒的菌落;挑取单菌落悬浮于 MedA 液体培养基后,转接至含 8% 蔗糖的固体平板进行第 2 次同源重组筛选。挑选在含蔗糖

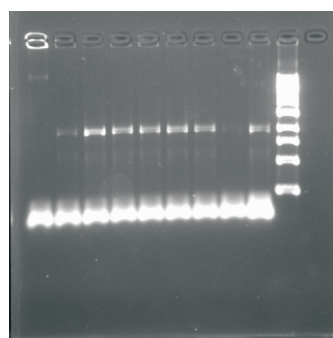
平板上生长良好的单菌落,进行菌落 PCR 及测序验证,结果证实目标片段已成功缺失(图 1(b)、1(c)),最终获得 *nifA2* N 端缺失突变株 ZX02。采用相同方法,将重组自杀质粒 pZ*nifA2* 转入已构建的 *nifA1* N 端缺失突变株 ZX01,经同源重组筛选,进一步获得 *nifA1/nifA2* N 端双缺失突变株 ZX03。

1.3 光发酵产氢试验方法

R. capsulatus SB1003 及其突变株在改良 MedA 产氢培养液中进行光发酵产氢试验。无铵产氢培养液以 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖为碳源、 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠为氮源配制;含铵产氢培养液则在上述基础上按既定比例补加硫酸铵作为混合氮源。取预培养至对数生长期的菌液,于转速为 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 5 min,弃去上清,用新鲜改良的培养液重悬洗涤 2 次。洗涤后的菌体用产氢培养液稀释至波长 660 nm 处的光密度(Optical Density, OD_{660})值为 0.3,作为光发酵产氢接种物。光发酵产氢反应器如图 2 所示,产氢反应器采用 30 mL 无菌注射器,工作体积为 10 mL。在光照培养箱中培养,光照强度保持在约 6000 lux,温度控制在 $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。所有实验均进行 3 次平行重复。



(a) 突变株的构建及筛选过程



(b) 菌落 PCR 验证

Query	101	TGACCGATCAACAATCCGCCCCGCTCGCCGCGG	160
Sbjct	72	TGACCGATCAACAATCCGCCCCGCTCGCCGCGG	113
Query	161	ACCGCCTTGCTTGGATGCGCTTACGAGATCGGAGACCTTTGCGCGCGCCGCGATC	220
Sbjct	114	ACCGCCTTGCTTGGATGCGCTTACGAGATCGGAGACCTTTGCGCGCGCCGCGATC	173
Query	221	CGGTGGCGGAGGTGCCGAGATCTTCAACGTGCTGCTCTTCTCGATCTGCGCCATG	280
Sbjct	174	CGGTGGCGGAGGTGCCGAGATCTTCAACGTGCTGCTCTTCTCGATCTGCGCCATG	233
Query	281	GGGTGCTGGCGCTTCTGGCCGAGCGGCGAGGGGCGGGGGTGAACCCCTATGTCATCG	340
Sbjct	234	GGGTGCTGGCGCTTCTGGCCGAGCGGCGAGGGGCGGGGGTGAACCCCTATGTCATCG	293
Query	341	CCGCGACGGCTTTCAGCGAGCCCGAGGCCCGCCCGCGGATGTGCTGCCGATGCCG	400
Sbjct	294	CCGCGACGGCTTTCAGCGAGCCCGAGGCCCGCCCGCGGATGTGCTGCCGATGCCG	353

(c) 目的基因测序验证

图 1 基因敲除及同源重组流程图

Fig. 1 Diagram of gene knockout and homologous recombination

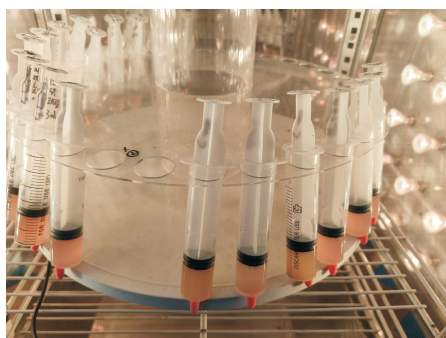


图2 光发酵反应器实物图

Fig. 2 Photograph of the photo-fermentation reactor

1.4 分析方法

菌体浓度采用紫外-可见分光光度计(DR6000, HACH)在波长 660 nm 下的光密度进行测定。光照培养箱的光强通过照度计(TES1330A, TES)进行测量。氢气浓度使用配备热导检测器(TCD)及 Porapak N 色谱柱的气相色谱仪(Agilent G2790A)进行分析,进样口温度为 120 ℃,TCD 温度为 200 ℃,柱温为 60 ℃,以 N_2 为载气,载气流速为 $35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。底物消耗量通过高效液相色谱仪(Agilent 1260 Infinity II)测定。液相样品在转速为 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 3 min,取上清液按照体积比 20:1 加入质量分数为 10% 的 H_2SO_4 充分混匀反应,随后经孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤后进行检测。流动相为量浓度为 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 ,流速为 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测器为示差折光检测器(RID)。

产氢曲线采用改进的 Gompertz 方程^[16-17]进行拟合,如下式所示

$$H = H_m \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_m e}{H_m}(T-t)+1\right]\right\} \quad (1)$$

式中: H 表示累计产氢量, $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$; H_m 表示最大产氢潜力, $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$; R_m 表示最大产氢速率, $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; e 为自然常数, $e = 2.718\,281\,828$; T 为迟滞期, h 。

1.5 实时定量 PCR 分析

在光发酵产氢过程中,将菌株在光照培养箱中于厌氧条件下培养,在产氢速率达到最快的时候收集细胞,然后使用细菌总核糖核酸(RNA)提取试剂盒(生工,中国)提取总 RNA。所得总 RNA 经 MightyScript Plus 第一链 cDNA 合成试剂盒(生工,中国)去除 DNA 污染并逆转录合成 cDNA。反应体系依次在 25 ℃ 孵育 5 min, 60 ℃ 孵育 15 min, 最后于 85 ℃ 保温 5 min 终止反应。所得 cDNA 产物作为实时定量 PCR 的模板。特异性引物通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库设计,以 16S rRNA 作为内参基因。采

用 SGExcel FastSYBR 预混液试剂盒(生工,中国),实时定量聚合酶链式反应(qPCR)反应体系总体积为 $20 \mu\text{L}$,扩增反应在荧光定量 PCR 仪(qTOWER 2.2, Analytik Jena)上进行,程序包括: 95 ℃ 预变性 3 min, 随后进行 40 个循环,每个循环包括 95 ℃ 变性 5 s 和 60 ℃ 退火 20 s。基因表达量采用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算,每个基因设置 3 个技术重复。转录水平的统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),显著性水平设定为 $p < 0.05$,统计分析使用 GraphPad Prism 8 软件完成。

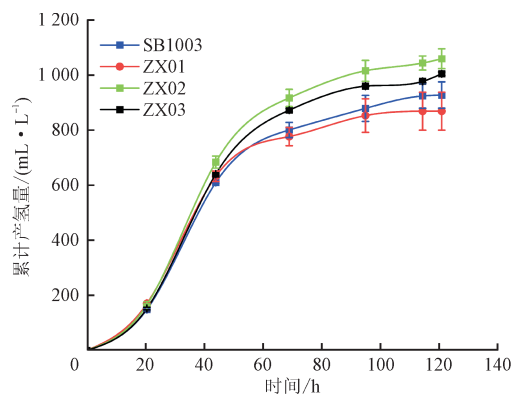
2 结果与讨论

2.1 *nifA* N 端的缺失对野生型和突变株光发酵产氢能力的影响

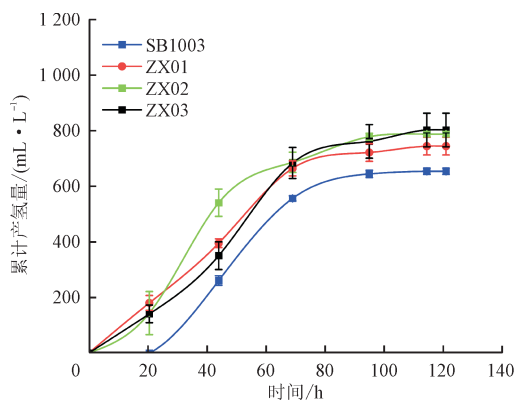
以 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖为碳源,野生型菌株与突变株分别在无铵和铵态氮质量分数为 20% ($0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铵和 $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠)条件下的产氢情况如图 3 所示。其中,铵态氮质量分数表示氮源中铵态氮占总氮的摩尔比例,总氮量浓度固定为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。之所以选择铵态氮质量分数为 20% 作为实验条件,是因为在前期预实验中发现,当铵态氮质量分数提高至 30% 时,野生型菌株的产氢量与 20% 条件相比差异不大,但突变株 ZX01 和 ZX02 的产氢量略有下降,使其相对于野生型的产氢提升幅度低于 20% 的条件。进一步比较不同铵质量分数下的产氢变化趋势发现,随着铵质量分数的增加,突变株相对于野生型的产氢提升幅度呈现先增加后减小的趋势,其中质量分数为 20% 是较为明显的阈值。当铵质量分数超过 20% 时,产氢提升幅度逐渐减小。因此,本研究选择铵态氮质量分数为 20% 作为代表性含铵条件,用于评价突变株在铵胁迫下的产氢性能。

如图所示,在无铵条件下,*nifA*2 N 端缺失突变株 ZX02 的累计产氢量最高为 $(1\,059.16 \pm 36.07) \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着铵的添加,各菌株的产氢量均呈下降趋势,这与已有研究结果一致^[18],表明铵对固氮酶活性具有显著抑制作用。与野生型相比,ZX01 在铵态氮质量分数为 20% 时表现出较强的耐铵能力,而 ZX02 的累计产氢量在有铵和无铵条件下均高于 ZX01。这一结果表明 *nifA*1 N 端的缺失可在一定程度上提高菌株的耐铵性,同时相比 *nifA*1, *nifA*2 对铵具有更高的耐受性。此外,双基因缺失突变株 ZX03 在两种条件下均保持较高的产氢水平,在有铵时,ZX03 的产氢量为 $(801.80 \pm 60.40) \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,与野

生型相比提高了 22.7%，说明单独删除 *nifA1* 或 *nifA2* 的 N 端结构均可削弱铵对固氮酶的抑制作用，从而在含铵条件下恢复固氮酶活性并提升产氢能力。当两者的 N 端同时被敲除时则产生协同效应，菌株对铵的敏感性进一步降低，从而显著提升菌株在含铵环境中的产氢效能与耐铵稳定性。另设置一组 30 mL 注射器专门用于液体取样。在培养过程中定期取样测定培养液的光密度 OD_{660} 值和 pH 值，以避免对产氢实验体系密闭性造成影响。图 4 展示了产氢过程中各菌株的生长和 pH 情况。在无铵条件下，所有菌株均正常生长，最终 OD_{660} 值接近且相对稳定，其中 ZX01 的生长略低于其他菌株。在铵态氮质量分数为 20% 条件下，ZX01 的最终 OD_{660} 值最低，为 1.9。在 pH 值变化方面，各菌株 pH 值随发酵进行逐渐下降。在含铵条件下，pH 值下降速度明显加快，且最终稳定值更低，其中 ZX01 的 pH 值降至 6.02，为所有菌株中最低。在发酵过程中 pH 值降低主要归因于葡萄糖被分解生成小分子有机酸，此外，固氮酶催化的产氢反应伴随着 CO_2 释放，溶解于培养基中形成碳酸，进一步降低了 pH 值。

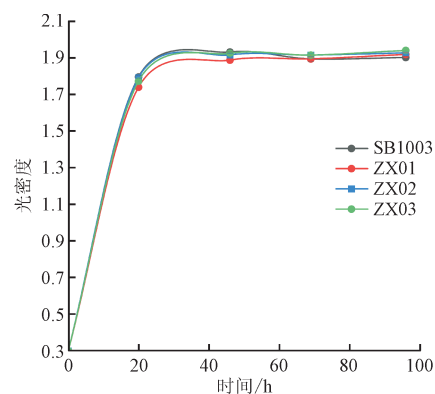


(a) 无铵条件

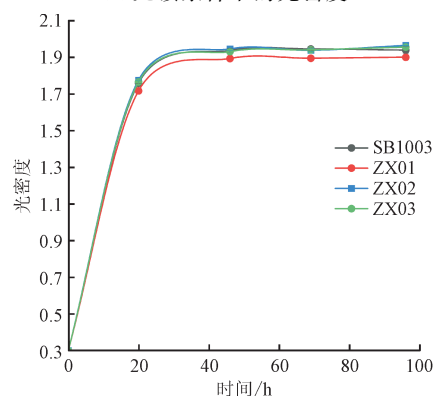


(b) 有铵条件(铵态氮质量分数为 20%)

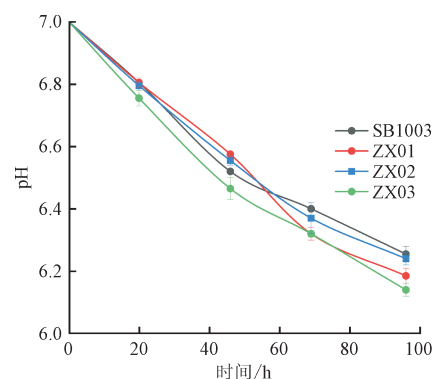
图 3 野生型和突变株在不同铵条件下的累计产氢量
Fig. 3 Cumulative hydrogen production of wild-type and mutant strains under different ammonium conditions



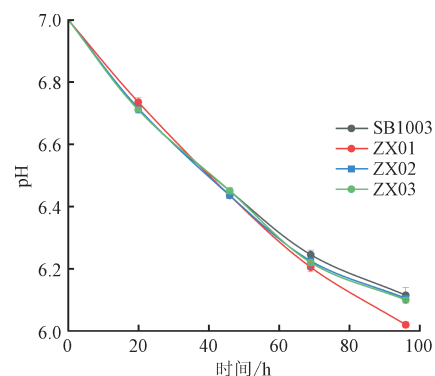
(a) 无铵条件下的光密度



(b) 有铵条件(铵态氮质量分数为 20%)下的光密度



(c) 无铵条件下的 pH



(d) 有铵条件(铵态氮质量分数为 20%)下的 pH

图 4 野生型和突变株在不同铵条件下的生长与 pH 变化
Fig. 4 Growth and pH changes of wild-type and mutant strains under different ammonium conditions

进一步采用 Gompertz 方程对产氢数据进行拟合,结果如表 2 所示。 R^2 (决定系数)是衡量模型拟合优度的常用指标,其取值范围为 0~1,数值越接近 1 表示模型的预测值与实验数据的吻合度越高,从结果来看各菌株产氢曲线的拟合优度 R^2 均达到 0.99 以上,表明该模型能够准确描述产氢过程的动力学特征。结果表明,在含铵条件下,所有菌株的最大产氢潜力 H_m 均有所下降,但双缺失突变株 ZX03 的下降幅度最小,其 H_m 为 $(837.09 \pm 33.23) \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,仍较野生型提高 27.2%,进一步证实双基因缺失可最大程度维持产氢潜力。虽然双突变株 ZX03 的最大产氢速率与 SB1003 相比并无显著提升,但 ZX03 在产氢稳定性与耐铵性方面表现更为优越,因此,其产氢速率能够在较长时间内保持相对稳定,使产氢过程可延长至 100 h,而 SB1003 在 80 h 后时几乎不再产氢,最终导致 ZX03 的累计产氢量更高。在有铵条件

下,所有突变株的产氢迟滞期均明显短于 SB1003,其中 ZX01 的滞后期最短,这可能归因于 *nifA1* N 端的缺失显著加速了铵的消耗及固氮酶活性的恢复。ZX02 在无铵条件下的产氢量与 SB1003 相比提高了 14.3%,说明 *nifA2* N 端敲除本身即可增强菌株的产氢能力,加入铵后,由于突变株耐铵性的进一步提升, ZX02 累计产氢量的提高幅度增至 19.4%。已有研究表明,在草螺菌(*Herbaspirillum seropedicae*)中,GAF 结构域的单点突变(G25E)使 NifA 蛋白不依赖 GlnK 蛋白且对铵部分抗性^[19]。因此,*R. capsulatus* 中 *nifA1* 与 *nifA2* 在 N 端有 19 个氨基酸差异,很可能导致两者与 GlnB 的结合亲和力或信号传递效率不同,*nifA1* 的 N 端缺失可以缩短产氢迟滞期;而 *nifA2* 的 N 端缺失可提高基础产氢能力。双缺失突变株 ZX03 则协同整合了两者优势,从而在含铵条件下表现出最优的产氢性能。

表 2 各突变菌株及野生型菌株产氢 Gompertz 方程拟合结果

Table 2 Fitting results of the Gompertz equation for hydrogen production by various mutant strains and the wild-type strain

菌株	铵态氮质量 分数/%	最大产氢潜力/ ($\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$)	最大产氢速率/ ($\text{mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	产氢迟滞 时间/h	R^2	$\Delta H_{\max}/\%$
SB1003	0	919.66 ± 11.56	19.71 ± 1.35	12.99 ± 1.62	0.99	
	20	657.94 ± 3.01	16.82 ± 0.50	28.60 ± 0.58	0.99	
ZX01	0	863.55 ± 9.02	20.94 ± 1.31	12.36 ± 1.30	0.99	-6.1
	20	769.26 ± 24.68	12.12 ± 1.36	7.99 ± 3.41	0.99	16.9
ZX02	0	1051.45 ± 10.11	22.39 ± 1.60	13.29 ± 1.24	0.99	14.3
	20	785.29 ± 12.08	17.26 ± 1.29	12.17 ± 1.71	0.99	19.4
ZX03	0	993.62 ± 9.12	21.34 ± 1.06	13.69 ± 1.18	0.99	8.0
	20	837.09 ± 33.23	12.83 ± 1.60	13.28 ± 3.85	0.99	27.2

注: $\Delta H_{\max}$ 为在相同的铵态氮质量分数条件下最大产氢率与野生型菌株增长率的百分比。

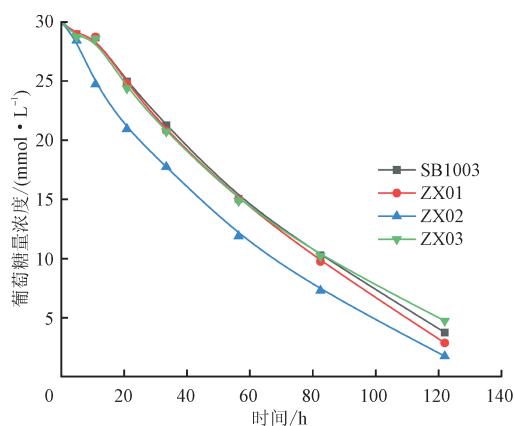
2.2 *nifA* N 端的缺失对野生型和突变株底物利用的影响

为进一步验证 *nifA* N 端在葡萄糖代谢中的作用,本研究以 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖为碳源,分别在无铵、有铵($6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸钠)和高铵(NH_4^+ 的量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下对不同菌株的底物利用情况进行了检测,结果如图 5 所示。由图 5 可见,在无铵条件下,*nifA2* N 端缺失突变株 ZX02 的葡萄糖浓度比其他菌株低,说明其葡萄糖利用效率更高,同时 ZX02 也表现出最高的累计产氢量(见表 2),而 *nifA1* N 端缺失突变株 ZX01 和双突变株 ZX03 的葡萄糖利用情况与野生型菌株 SB1003 差异不显著。值得注意的是,尽管 ZX03 的累计产氢量超过了

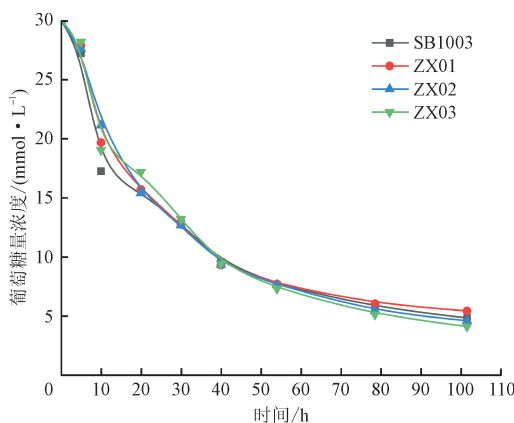
SB1003,但其葡萄糖利用效率并未呈现出与产氢量成正比的提升,并且在 100~120 h 之间,菌株的产氢增量减少,但葡萄糖仍存在明显消耗,这表明底物消耗与产氢之间并不存在简单的线性关系。葡萄糖的氧化分解不仅为氢气生成提供质子和还原力,同时也支持细胞生长及其他多种代谢过程^[20]。以 NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (添加浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸铵)为唯一氮源时,野生型和突变株的葡萄糖浓度无显著差异。与在无铵条件下相比,铵的添加促进了菌株前 60 h 的底物利用,但随后消耗速率逐渐下降,在 90 h 后几乎不消耗。尽管铵的存在会抑制固氮酶的活性,导致产氢量大幅减少,但是葡萄糖依旧有较高的利用率,说明此时葡萄糖更多地被用于细

胞生长及其他代谢途径而不是产氢。

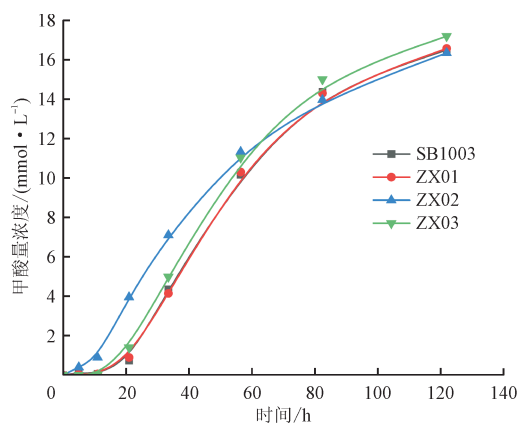
除了葡萄糖外,在发酵液中还检测到了甲酸的生成。在光合细菌中,葡萄糖通过 Entner-Doudoroff (ED)途径分解^[21],生成的丙酮酸可在丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)的作用下转化为甲酸和乙酰辅酶 A。甲酸属于葡萄糖代谢的中间产物,其生成伴随产氢过程。在无铵条件下,甲酸量浓度随时间而逐渐增加,ZX03 的最终甲酸生成量最高,产量为 17.2 mmol。在高铵条件下,所有菌株的甲酸产量均大幅降低,ZX01 的最终甲酸生成量最高,产量为 6.2 mmol,且甲酸量浓度呈现先升高后降低的趋势,表明甲酸在发酵后期可能被进一步代谢。然而,各菌株间的甲酸积累量差异较小,且整体产量较低,与产氢量无显著相关性。因此,甲酸主要作为葡萄糖代谢的中间产物伴随产氢过程产生,其积累与消耗对产氢效率无显著影响。综合葡萄糖消耗与产氢数据可知,*nifA* N 端的敲除并未显著改变底物的总消耗率,然而,由于突变株在产氢量上明显高于野生型,可以推测其葡萄糖代谢通量更倾向于流向产氢相关途径,而非其他竞争性代谢分支,从而提高了底物向氢气生成的转化效率。



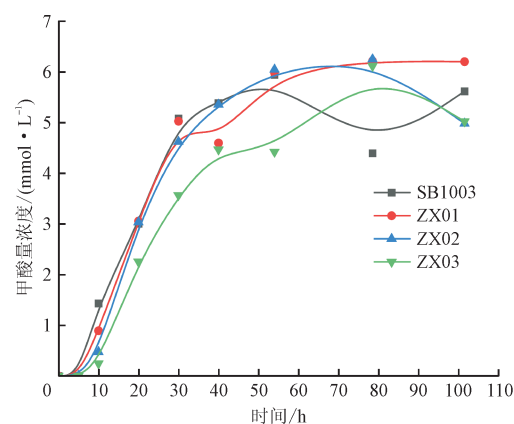
(a) 无铵条件下的葡萄糖变化



(b) 有铵条件(NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下的葡萄糖变化



(c) 无铵条件下的甲酸变化



(d) 有铵条件(NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下的甲酸变化

图 5 野生型和突变株在不同铵条件下的底物浓度变化

Fig. 5 Variations in substrate concentration of wild-type and mutant strains under different ammonium conditions

2.3 *nifA* N 端的缺失对野生型和突变株基因表达的影响

为阐明 *nifA* N 端结构域的功能,本研究在不同氮源条件下检测了野生型与突变株的基因表达水平。已知 *nifA* 蛋白是一种依赖 σ_{54} 的转录激活因子,在光合细菌中调控固氮相关基因的转录,并受到氮源状态和氧气水平的调节^[22]。*glnB* 编码的 PII 蛋白是氮代谢的重要信号转导因子,能感受细胞内谷氨酰胺/ α -酮戊二酸水平和能量状态。在 *R. capsulatus* 中,*glnB1* 和 *glnB2* 通过与 DraT/DraG 系统和 Ntr 信号通路互作间接影响 *nifA* 蛋白的活性。因此,检测突变株中 *glnB* 表达的变化,有助于解析 *nifA* N 端缺失对氮代谢调控网络的影响。在产氢实验中,菌株分别无铵培养基与含 NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中进行培养。qPCR 检测的时间点分别选取在无铵条件下的 34 h 和高铵条件下的 59 h (图 6),在此时间点时光合细菌产氢的速率较快。

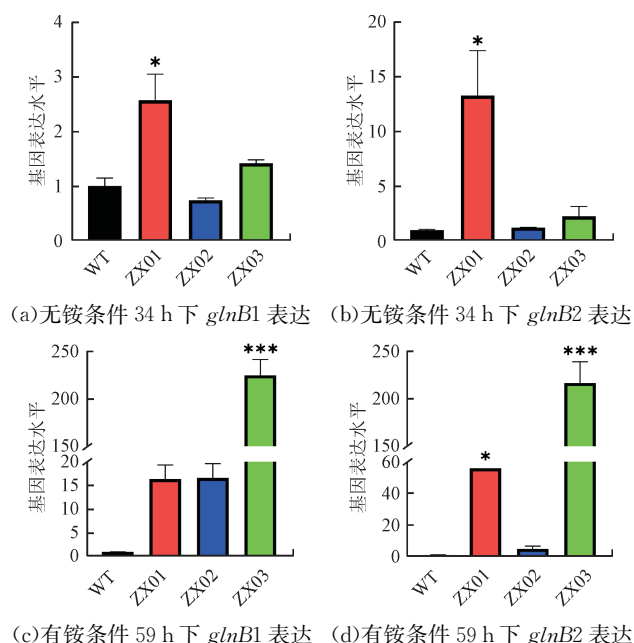


图 6 野生型和突变株在无铵条件和有铵条件(NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下的 *glnB1* 与 *glnB2* 的表达水平
Fig. 6 Expression levels of *glnB1* and *glnB2* in the wild-type and mutant strains under ammonium-free conditions and ammonium conditions ($8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4^+$)

图 6 结果显示,在无铵条件下,只有 ZX01 的 *glnB* 表达显著上调,尤其是 *glnB2* 的转录水平显著高于野生型。在高铵条件下,*glnB* 表达水平整体呈大幅上调趋势,其中 ZX03 的 *glnB1* 与 *glnB2* 转录水平较野生型升高近 220 倍。此外,铵的添加使 ZX01 的 *glnB2* 基因表达水平上调了 55 倍,而在无铵条件下 ZX01 的 *glnB2* 基因表达水平仅上调了 16 倍。总体来看,无论是否存在铵,ZX01 的 *glnB* 表达均高于 SB1003,而 ZX03 在高铵条件下表现出最强的上调效应。相比之下,单独的 *nifA2* N 端缺失对 *glnB* 表达无显著影响。

上述结果表明,在双突变株中,*nifA* 的 N 端结构域的破坏影响了氮代谢调控网络的平衡,从而造成 *glnB* 在高铵条件下表达水平上调。已有研究表明,在光合细菌深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中,*glnB* 蛋白通过其尿酰化形式与 *hifA* 的 N 端 GAF 结构域发生直接蛋白相互作用,从而激活 *nifA* 的转录活性^[23]。当 *nifA* 的 N 端结构域发生突变或缺失时,这种互作可能被破坏,导致 *glnB* 反馈调节通路的异常激活。

另一方面,为阐明不同突变株在电子传递层面的调控差异,本研究进一步检测了与固氮酶电子供体密切相关的基因 *fldA* 和 *rnfB* 的表达水平。

fldA 编码黄素氧化还原蛋白 (flavodoxin),在电子传递链中介导电子高效转移,是固氮酶活化及产氢过程的关键。*rnfB* 属于 RNF 复合体的重要组成部分,该复合体参与跨膜电子转运,对电子分配方向及效率具有重要调控作用。已有研究表明,产氢能力与电子传递密切相关^[24]。

如图 7 所示,在无铵条件下,双缺失突变株 ZX03 的 *rnfB* 与 *fldA* 转录水平均显著高于野生型 SB1003 及其他单突变株,表明其基础电子传递链活性更强,能够为固氮酶提供更充足的还原力。而在高铵条件下,双突变株 ZX03 的 *fldA* 的表达水平仍维持在相对高位,且明显高于野生型,其 *rnfB* 表达亦表现出类似的耐铵稳定性。有研究表明 *nifA* 调节电子传递体 *rnf1* 基因簇的表达^[25],在 *R. capsulatus* 中,*rnf* 基因与固氮基因簇相邻,其表达受 *nifA* 的转录激活^[26]。因此,ZX03 中 *rnfB* 的持续高表达,可能是由于 N 端缺失的 *nifA* 突变株在含铵条件下仍保持部分转录激活功能,持续激活 *rnf* 操纵子。此外,*fldA* 编码的黄素氧化还原蛋白作为固氮酶的生理电子供体,其表达上调也可能间接受益于 N 端缺失导致的全局固氮基因去抑制状态。

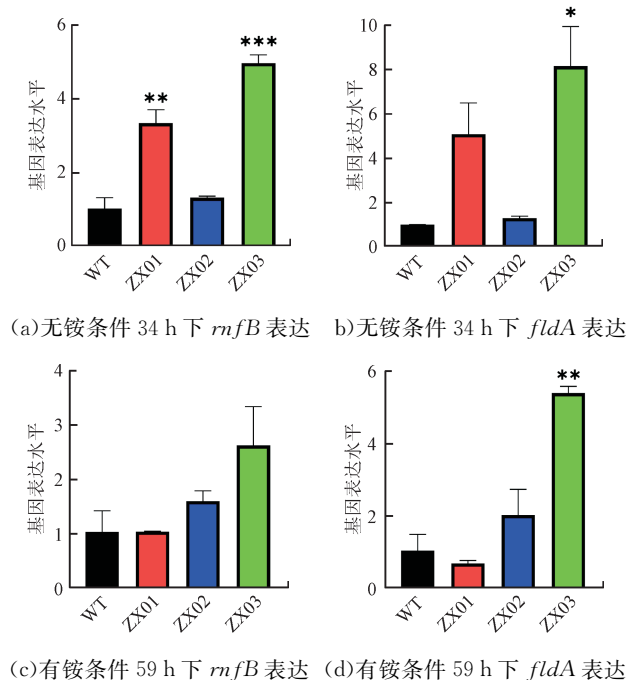


图 7 野生型和突变株在无铵条件和有铵条件(NH_4^+ 量浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下的 *rnfB* 与 *fldA* 的表达水平
Fig. 7 Expression levels of *rnfB* and *fldA* in the wild-type and mutant strains under ammonium-free conditions and ammonium conditions ($8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4^+$)

综合来看,*nifA* N端缺失不仅解除了铵对固氮酶基因的抑制,还通过维持*nifA*对电子传递基因的激活作用,从还原力供应层面保障了固氮酶的持续活性。相比之下,单突变株ZX01与ZX02对*fldA*与*rmfB*的调控作用较弱,其表达水平在含铵条件下与野生型接近或仅轻微上调,未能形成如ZX03般的显著优势,进一步凸显双突变株在电子代谢调控上的独特优势。

3 结 论

基于对*R. capsulatus* SB1003及其*nifA* N端缺失突变株在光发酵产氢过程中的系统研究,本研究阐明了*nifA* N端结构域在耐铵性调控与产氢代谢中的关键作用,主要结论如下:

(1)证实了*nifA* N端缺失是增强光合细菌耐铵性与产氢能力的有效策略。成功构建的*nifA1* N端缺失株ZX01、*nifA2* N端缺失株ZX02及双缺失突变株ZX03均在不同程度上缓解了铵对固氮酶活性的抑制。其中,双缺失突变株ZX03在含铵(铵态氮质量分数为20%)条件下表现最优,其累计产氢量达 $801.80 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$,较野生型显著提高22.7%,体现了双基因缺失的协同增效作用。Gompertz方程拟合结果表明,突变株并非通过显著提高最大产氢速率,而是通过大幅缩短产氢迟滞期并延长有效产氢时间来实现更高的累计产氢量。在含铵条件下,ZX03的迟滞期(13.28 h)远短于野生型(28.60 h),且其最大产氢潜力 H_m 的下降幅度最小,证明了其在铵胁迫下维持产氢潜力和稳定性的卓越能力。

(2)揭示了突变株通过代谢流重定向提升底物转化效率的机制。尽管各突变株的葡萄糖总消耗率与野生型无显著差异,但其产氢量显著更高,表明*nifA* N端缺失促使碳代谢流更倾向于流向产氢相关的还原力生成途径,而非其他竞争性分支。

(3)从分子层面阐明了*nifA* N端缺失影响氮代谢与电子传递的调控网络。qPCR分析发现,*nifA* N端缺失对氮信号基因(*glnB1/glnB2*)和电子传递基因(*rmfB/fldA*)的表达水平产生特异性调控。ZX01主要上调*glnB*表达,而ZX03在含铵条件下能协同、强烈地上调所有检测基因的表达水平(*glnB*上调近220倍),同时维持较高的电子传递基因转录水平,这为固氮酶在铵存在下持续获得充足还原力提供了分子基础,从转录水平解释了其优越表型。

参考文献:

[1] 路朝阳,孙鹏,张全国,等. Fe^{2+} 浓度对玉米芯光合

生物制氢的影响[J]. 热科学与技术, 2024, 23(6): 527-532.

Lu Chaoyang, Sun Peng, Zhang Quanguo, et al. Effect of Fe^{2+} concentration on photo-fermentation biohydrogen production from corncob [J]. Journal of Thermal Science and Technology, 2024, 23(6): 527-532.

[2] Rupprecht J, Hankamer B, Mussgnug J H, et al. Perspectives and advances of biological H_2 production in microorganisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(3): 442-449.

[3] 沈元兴,黄磊. 生物质制氢技术研究[J]. 能源与环境, 2025(1): 68-71.

Shen Yuanxing, Huang Lei. Research on biomass hydrogen production technologies [J]. Energy and Environment, 2025(1): 68-71.

[4] 屈皓,李玉霞,刘玉香. 生物质光发酵制氢技术研究进展[J]. 现代化工, 2025, 45(1): 56-61.

Qu Hao, Li Yuxia, Liu Yuxiang. Research progress in biomass photo-fermentative hydrogen production technology [J]. Modern Chemical Industry, 2025, 45(1): 56-61.

[5] 钱一帆,郑广宏,康铸慧,等. 不产氧光合细菌*Rhodobacter sphaeroides*产氢影响因子研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(5): 6-12.

Qian Yifan, Zheng Guanghong, Kang Zhuhui, et al. Influence of factors on hydrogen production capability of *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(5): 6-12.

[6] Maséphl B, Hallenbeck P C. Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* [C]//Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes. New York: Springer, 2010: 49-70.

[7] Drepper T, Groß S, Yakunin A F, et al. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* [J]. Microbiology, 2003, 149(8): 2203-2212.

[8] Monteiro R A, Souza E M, Funayama S, et al. Expression and functional analysis of an N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* [J]. FEBS Letters, 1999, 447(2/3): 283-286.

[9] Sistrom W R. A requirement for sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides* [J]. Journal of General Microbiology, 1960, 22(3): 778-785.

[10] Yen H C, Marrs B. Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas*

- capsulata [J]. Journal of Bacteriology, 1976, 126(2): 619-629.
- [11] Gao Zixuan, Wei Xuan, Wang Minmin, et al. Genetically engineered deletion in the N-terminal region of *nifA1* in *R. capsulatus* to enhance hydrogen production [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2023, 48(77): 29916-29927.
- [12] Herrero M, de Lorenzo V, Timmis K N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(11): 6557-6567.
- [13] Ditta G, Stanfield S, Corbin D, et al. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria; construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980, 77(12): 7347-7351.
- [14] Yano T, Sanders C, Catalano J, et al. *sacB*-5-fluoroorotic acid-pyrE-based bidirectional selection for integration of unmarked alleles into the chromosome of *Rhodobacter capsulatus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3014-3024.
- [15] Gao Zixuan, Gao Xintong, Ma Yu, et al. Genetically engineered *nifA* mutations in *Rhodobacter capsulatus* to enhance ammonium tolerance and hydrogen production [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2025, 144: 252-261.
- [16] Chen C Y, Lu Weibin, Liu C H, et al. Improved phototrophic H_2 production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3609-3616.
- [17] 张安龙, 王晔, 王雪青, 等. 光合细菌利用秸秆解聚液制氢的优化研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2018, 36(1): 17-22.
- Zhang Anlong, Wang Ye, Wang Xueqing, et al. Optimization of hydrogen production from photosynthetic bacteria by depolymerized corn stalk [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2018, 36(1): 17-22.
- [18] 王毅, 周雪花, 张志萍, 等. 光合细菌产氢过程中氮源利用实验 [J]. 农业机械学报, 2014, 45(10): 194-199.
- Wang Yi, Zhou Xuehua, Zhang Zhiping, et al. Nitrogen source utilization of photosynthetic bacteria in process of hydrogen production [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(10): 194-199.
- [19] Aquino B, Stefanello A A, Oliveira M A S, et al. Effect of point mutations on *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2015, 48(8): 683-690.
- [20] 黄加亮, 穆兰, 武婉婷, 等. 4种混合光合厌氧产氢菌群的筛选及产氢性能研究 [J]. 环境工程, 2024, 42(9): 301-310.
- Huang Jialiang, Mu Lan, Wu Wanting, et al. Screening and hydrogen production performance of four mixed photosynthetic anaerobic hydrogen-producing bacterial flora [J]. Environmental Engineering, 2024, 42(9): 301-310.
- [21] Conrad R, Schlegel H G. Different degradation pathways for glucose and fructose in *Rhodospseudomonas capsulata* [J]. Archives of Microbiology, 1977, 112(1): 39-48.
- [22] Glyde R, Ye Fuzhou, Darbari V C, et al. Structures of RNA polymerase closed and intermediate complexes reveal mechanisms of DNA opening and transcription initiation [J]. Molecular Cell, 2017, 67(1): 106-116.
- [23] Zou Xiaoxiao, Zhu Yu, Pohlmann E L, et al. Identification and functional characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* [J]. Microbiology, 2008, 154(9): 2689-2699.
- [24] 陈冠益, 黄加亮, 穆兰, 等. 添加剂调控光合发酵制氢进展与展望 [J]. 太阳能学报, 2025, 46(5): 1-14.
- Chen Guanyi, Huang Jialiang, Mu Lan, et al. Progress and prospects of additive-regulated photosynthetic fermentation for hydrogen production [J]. Acta Energiae Solaris Sinica, 2025, 46(5): 1-14.
- [25] 黄义, 刘伟, 陆超, 等. 施氏假单胞菌固氮调控蛋白 NifA 调节电子传递体 *rnf1* 基因簇的表达 [J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(8): 39-45.
- Huang Yi, Liu Wei, Lu Chao, et al. Effect of the nitrogen fixation positive regulator NifA on the transcription of the electron transport complex *rnf1* cluster in *Pseudomonas stutzeri* [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2018, 20(8): 39-45.
- [26] Schmehl M, Jahn A, Meyer zu Vilsendorf A, et al. Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*; a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase [J]. Molecular and General Genetics, 1993, 241(5): 602-615.

(编辑 刘杨 陶晴)