

常压室温等离子体强化微生物固碳效能与代谢调控机制

彭梓怡^{1,2,3}, 宋佳宇^{1,3*}, 袁野^{1,2,3}, 陈姝畅⁴, 付爱民^{1,3,5}, 任金蔓^{1,3,5},
张华^{1,3}, 李兴春^{1,3}, 刘玉龙^{1,3}, 吴百春^{1,3}, 王庆宏², 陈春茂²

- 1 中国石油集团安全环保技术研究院有限公司, 北京
- 2 中国石油大学(北京) 化学工程与环境学院, 北京
- 3 石油石化污染物控制与处理国家重点实验室, 北京
- 4 太原理工大学 环境与生态学院, 山西 太原
- 5 大庆油田水务环保公司, 黑龙江 大庆

彭梓怡, 宋佳宇, 袁野, 陈姝畅, 付爱民, 任金蔓, 张华, 李兴春, 刘玉龙, 吴百春, 王庆宏, 陈春茂. 常压室温等离子体强化微生物固碳效能与代谢调控机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(6): 2881-2897.

PENG Ziyi, SONG Jiayu, YUAN Ye, CHEN Shuchang, FU Aimin, REN Jinman, ZHANG Hua, LI Xingchun, LIU Yulong, WU Baichun, WANG Qinghong, CHEN Chunmao. Atmospheric and room temperature plasma enhances microbial carbon fixation efficiency by metabolic regulation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(6): 2881-2897.

摘要: 【目的】高效固碳微生物是实现“双碳”目标的关键功能资源, 但天然菌株的固碳性能不稳定, 难以直接满足工业化应用需求, 且常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变强化固碳性能的分子机制尚不明确。【方法】以实验室保藏的5株固碳菌作为出发菌株, 通过ARTP诱变结合定向筛选及固碳酶活性追踪, 构建了遗传稳定的高效固碳诱变菌B4-5, 并基于全基因组测序、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与插入/缺失(insertion/deletion, InDel)联合分析及代谢表征, 系统解析其固碳强化机制。【结果】诱变菌B4-5的关键固碳酶活性提升33.16%, 碳同化量及碳同化速率分别提高72.54%和72.61%, 其核心固碳途径为卡尔文循环。全基因组比对显示, 诱变菌与出发菌基因组整体共线性良好(相似度>98.50%), 表明诱变菌基因组结构未发生大规模染色体结构变异。SNP与InDel联合分析鉴定出4个与固碳性能相关的关键突变位点(*spoIIIE*、*nprR*、*glnQ*、*murB*), 这些位点通过优化碳源分配、协同碳氮代谢平衡及重编程碳流, 构建了“基因组微变异-代谢调控-表型强化”的级联机制。【结论】本研究阐明了ARTP诱变驱动的固碳代谢强化调控机制, 为微生物碳中和技术开发提供了理论依据与工程菌株资源。

关键词: 高效固碳菌; 常压室温等离子体诱变; 全基因组分析; RubisCO酶活性; 碳同化效能; 调控机制

资助项目: 中国石油天然气股份有限公司科技项目(2023ZZ1303)

This work was supported by the Science and Technology Project of PetroChina Company Limited (2023ZZ1303).

*Corresponding author. E-mail: songjiayu@cnpc.com.cn

Received: 2025-12-06; Accepted: 2025-12-29; Published online: 2026-01-19

Atmospheric and room temperature plasma enhances microbial carbon fixation efficiency by metabolic regulation

PENG Ziyi^{1,2,3}, SONG Jiayu^{1,3*}, YUAN Ye^{1,2,3}, CHEN Shuchang⁴, FU Aimin^{1,3,5}, REN Jinman^{1,3,5}, ZHANG Hua^{1,3}, LI Xingchun^{1,3}, LIU Yulong^{1,3}, WU Baichun^{1,3}, WANG Qinghong², CHEN Chunmao²

1 CNPC Research Institute of Safety & Environment Technology, Beijing, China

2 College of Chemical Engineering and Environment, China University of Petroleum-Beijing, Beijing, China

3 State Key Laboratory of Petroleum Pollution Control, Beijing, China

4 College of Environment and Ecology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi, China

5 Daqing Oilfield Water Environmental Protection Company, Daqing, Heilongjiang, China

Abstract: [Objective] Efficient carbon-fixing microorganisms are a critical functional resource for achieving the “dual carbon” goals. However, the unstable carbon fixation performance makes natural strains difficult to directly meet industrial application needs. The molecular mechanisms underlying the enhancement of carbon fixation performance by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis remain unclear. **[Methods]** Five carbon-fixing bacterial strains preserved in our laboratory were used as the starting strains. Through ARTP mutagenesis combined with directed screening and carbon-fixing enzyme activity tracking, a genetically stable and efficient carbon-fixing mutant B4-5 was constructed. Whole-genome sequencing, combined analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) and insertion/deletion (InDel), and metabolic characterization were employed to systematically elucidate the carbon fixation enhancement mechanism. **[Results]** The mutant B4-5 showed increases of 33.16%, 72.54%, and 72.61% in key carbon-fixing enzyme activity, carbon assimilation amount, and carbon assimilation rate, respectively, with the Calvin cycle serving as the core carbon fixation pathway. Whole-genome comparison revealed that the genome of the mutant was highly collinear with that of the parent strain (similarity>98.50%), indicating that there were no large-scale chromosomal structural variations in the genome of the mutant. The combined analysis of SNP and InDel identified four key mutation sites (*spoIIE*, *nprR*, *glnQ*, and *murB*) related to carbon fixation performance, and these sites optimized carbon source allocation, coordinated carbon-nitrogen metabolism balance, and reprogrammed carbon flux. Finally, a cascade mechanism of genomic micro-variation-metabolic regulation-phenotype enhancement was established. **[Conclusion]** This study clarifies the regulatory mechanism underlying the enhancement of carbon fixation metabolism by ARTP mutagenesis, providing a theoretical basis and engineered strain resources for the development of microbial carbon neutralization technologies.

Keywords: efficient carbon-fixing bacteria; atmospheric and room temperature plasma mutagenesis; genome-wide analysis; RubisCO activity; carbon assimilation efficiency; regulatory mechanism

全球气候变化已成为 21 世纪人类社会面临的重大挑战，大气 CO₂ 浓度从工业革命前的

280 μL/L 攀升至 2022 年的 418 μL/L^[1]，由此引发的温室效应与生态系统失衡问题亟待解决^[2]。

生物固碳作为调控全球碳循环、实现碳中和目标的核心路径,因其具有环境友好、能耗低及可持续等优势^[3-4],被政府间气候变化专门委员会列为实现全球温控目标的关键负排放技术之一^[5]。微生物固碳凭借代谢途径多样、遗传可改造性强等特点,在CO₂生物转化领域展现出独特潜力^[6]。目前已知的微生物固碳途径主要包括卡尔文循环、还原性三羧酸循环、还原性乙酰辅酶A途径、3-羟基丙酸双循环途径等^[7]。然而,天然固碳微生物普遍存在效率瓶颈:关键功能酶(如RubisCO)受底物亲和力不足及氧抑制效应限制^[8];菌株遗传稳定性差,传代过程中易发生性状漂变^[9];环境适应性弱,难以满足规模化应用需求。因此,开发高效固碳微生物定向选育技术并解析其性能提升机制,是突破生物固碳工程化瓶颈的关键科学问题^[10-11]。

ARTP诱变技术利用低温等离子体产生的高能粒子诱导基因组随机突变,具有突变率高、诱变时间短且条件温和等优势^[12-14]。该技术已在工业菌株改良及环境功能菌株性能提升方面取得显著成效,能够有效解决天然微生物普遍存在的酶活性偏低、产能不足等核心局限,为菌株代谢效能的定向强化提供了关键技术支撑^[15-16]。然而,该技术在微生物代谢固碳性能定向改良中的应用仍处于起步阶段,现有研究多依赖CO₂耐受性、光合效率等表型筛选^[17-18],缺乏对遗传变异与固碳表型关联的分子机制的系统解析^[19-20]。全基因组重测序结合单核苷酸多态性与插入/缺失(single nucleotide polymorphism and insertion/deletion, SNP/InDel)检测可全景式捕捉突变位点、解析代谢通路重构规律^[21-22],为揭示ARTP诱变强化固碳性能的分子机制提供了有力工具,但相关研究鲜有报道。

本研究以实验室前期分离保存的固碳菌为材料,采用ARTP诱变技术结合多代定向筛选策略成功构建遗传稳定的高效固碳诱变菌。通过整合表型表征(固碳酶活性、碳同化参数)与基因组解析(全基因组测序、SNP/InDel检测、代

谢通路注释),系统揭示突变株固碳性能提升的遗传基础。本研究旨在针对天然固碳微生物核心固碳酶(RubisCO)活性不足的关键问题,初步阐明“基因变异-表型强化”的内在关联机制,为生物固碳技术工程化应用提供理论依据与菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

选用实验室前期经无碳源无机盐培养基分离筛选并保藏的5株固碳菌(B1-B5)作为出发菌。经分类鉴定确定其物种归属依次为:利沃夫氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*) B1、木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*) B2、产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*) B3、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) B4及路氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) B5。

1.1.2 培养基

LB培养基(g/L):蛋白胨 10.00,酵母粉 5.00,NaCl 10.00,调节pH至7.0-7.2,随后于121 °C灭菌20 min。

无碳源无机盐培养基(g/L)^[23]:NH₄Cl 0.50, K₂HPO₄ 1.80, KH₂PO₄ 1.80, MgSO₄ 0.40, CaCl₂ 0.05, NaCl 1.00, MnSO₄ 0.02, FeCl₃ 0.02, Na₂S₂O₃ 10.00 g,调节pH至7.2-7.4,随后于121 °C灭菌20 min。配制固体培养基时,灭菌前加入琼脂粉 18.00 g/L。

1.1.3 供试基质

碳同化能力验证所用基质采自我国华北地区某油田作业区的落地油泥与钻井岩屑混合物。供试基质pH为8.67±0.31,全氮含量(0.75±0.18) g/kg,总磷含量(0.47±0.08) g/kg,有机碳含量(59.34±2.81) g/kg,石油烃含量(1.56±0.32) g/kg,具体测试方法如表1所示。

1.2 RubisCO酶活性测定

采用土壤(soil) RubisCO ELISA试剂盒(上海

表1 供试基质基础理化指标

Table 1 Basic physicochemical properties of test substrates

Test specification	Test method	Content	References
pH	Soil-determination of pH-potentiometry: HJ 962—2018	8.67±0.31	[24]
Total nitrogen	Soil quality-determination of total nitrogen-modified Kjeldahl method: HJ 717—2014	(0.75±0.18) g/kg	[25]
Total phosphate	Soil-determination of total phosphorus by alkali fusion-Mo-Sb anti spectrophotometric method: HJ 632—2011	(0.47±0.08) g/kg	[26]
Organic carbon	Soil-determination of organic carbon-potassium dichromate oxidation spectrophotometric method: HJ 615—2011	(59.34±2.81) g/kg	[27]
Total petroleum hydrocarbons	Soil and sediment-determination of petroleum hydrocarbons (C10–C40)-gas chromatography: HJ 1021—2019	(1.56±0.32) g/kg	[28]

瑞番生物科技有限公司)测定菌株 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RubisCO)活性, 操作步骤参照试剂盒说明书执行。

1.3 ARTP 诱变

1.3.1 菌株预处理

取过夜培养物(LB 培养基, 30 °C、180 r/min 培养), 14 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。菌体经无菌水洗涤 2 次后, 重悬于含 5% 甘油的无菌水中, 调整菌悬液 OD_{600} 至 0.6, 备用。

1.3.2 涂布操作

取洁净载玻片经酒精灯灼烧 30 s 灭菌, 冷却至室温后, 取 10 μ L 菌悬液均匀涂布于载玻片表面。

1.3.3 诱变处理

将载玻片置于 ARTP 诱变仪(无锡源清天木生物科技有限公司)样品槽内, 设定诱变参数: 处理距离 2 mm, 功率 120 W, 氦气(纯度 99.999%)气流量 10 SLM, 处理时间为 10–100 s (间隔 10 s, 共 10 个梯度), 样品总体积 10 μ L 菌悬液。

1.3.4 诱变菌液制备与计数

处理后, 将载玻片分别移入含 1.00 mL 无菌生理盐水的 EP 管中, 涡旋振荡 1 min 洗脱菌体, 获得诱变菌悬液。梯度稀释以 10^{-1} 的梯度稀释至菌液浓度为 10^8 CFU/mL 后, 取 100 μ L

涂布于无碳源无机盐固体培养基(见 1.1.2 节)。以未经 ARTP 处理的菌悬液作为对照, 同步涂布。30 °C 培养 48 h 后统计菌落数, 按公式(1)和(2)分别计算致死率与正突变率, 确定最佳诱变时间。

$$\text{致死率} = \left(1 - \frac{\text{诱变组存活菌落数}}{\text{对照组存活菌落数}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

正突变率 =

$$\frac{\text{RubisCO酶活提高20%以上的突变菌株数}}{\text{诱变菌株总数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.4 高效固碳菌筛选

1.4.1 菌株初筛

从 1.3.4 节 ARTP 诱变培养平板中挑选直径最大的单菌落, 通过平板划线法在 LB 固体培养基上连续纯化, 获得纯培养菌株(排除生长缺陷株)。挑取纯化单菌落接种至 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养过夜后, 按 2% 接种量转接至无碳源无机盐液体培养基(1.1.2 节)中。以未诱变的出发菌(B1–B5)为对照, 平行培养。37 °C、200 r/min 培养 7 d 后, 测定 OD_{600} 值。

1.4.2 菌株复筛

以“ OD_{600} 值最大”为筛选指标, 结合菌落形态观察(排除异常表型), 采用 1.2 节方法测定 RubisCO 酶活性, 以“RubisCO 酶活性显著高于出发菌($P < 0.05$)”为核心正向筛选依据, 筛选获

得固碳潜力优异的候选菌株。将候选菌株接种于含 20% 甘油的 LB 培养基中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏, 备用。

1.5 诱变菌遗传稳定性分析

选取筛选获得的高效固碳诱变菌, 采用无碳源无机盐液体培养基连续传代 20 次。每代按 2% 接种量转接至 5.00 mL 新鲜培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 48 h。每次培养结束后测定 RubisCO 酶活性, 通过比较不同传代次数下的酶活性变化评估遗传稳定性。

1.6 碳同化能力验证

1.6.1 样品制备

供试基质经自然风干、研磨过 200 目筛后, 准确称取 40.00 g 于灭菌 100 mL 烧杯中。分别制备诱变菌及出发菌菌悬液 ($OD_{600}=0.8$), 按 10% 接种量 (4.00 mL) 加入固废样品, 在 100 mL 烧杯中充分混匀。每组设置 3 个生物学重复, 另设空白对照 (仅添加等量无菌培养基)。

1.6.2 ^{13}C 标记培养

将接种样品和盛有 0.569 g $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ (溶于 5.00 mL 纯水) 的烧杯一同置于密闭培养箱, 通过进气管通入不含 CO_2 的氮氧混合气 (N_2 79%, O_2 21%, 纯度 99.999%), 持续通气并使用 CO_2 气体分析仪监测出气口 CO_2 浓度, 待浓度接近 $0\text{ }\mu\text{L/L}$ 时停止通气。通过密封装置的专用接口, 将 40 mL 1 mol/L 盐酸注入盛有 $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ 溶液的烧杯中 (盐酸过量以确保反应完全), 立即关闭进出气阀门使装置与外界隔绝。待 CO_2 气体分析仪监测 CO_2 浓度达 $500\text{ }\mu\text{L/L}$ 时开启内置风扇促进气体均匀分布。为了降低微生物呼吸及残余 CO_2 对 $^{13}\text{CO}_2$ 稀释效应、提高土壤有机碳的 $\delta^{13}\text{C}$ 标记值, 每隔 3 d 重复上述标记过程, 标记周期共 30 d。培养期间采用称重法监测样品含水率, 通过补充无菌去离子水维持在 20%–25%。对照组以 Na_2CO_3 替代 $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$, 其余处理条件相同。标记结束后收集样品供后续分析。实验装置图如图 1 所示。

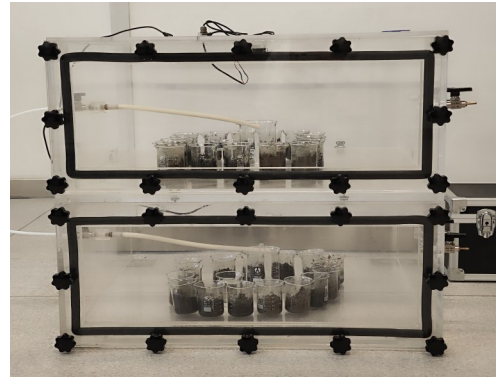


图1 碳同化能力验证实验装置图

Figure 1 Schematic diagram of the experimental setup for verifying carbon assimilation capacity.

1.6.3 碳同化量计算

培养结束后, 样品冷冻干燥、研磨均化, 采用同位素比率质谱仪 (ThermoFisher Scientific 公司) 测定 $\delta^{13}\text{C}$ 值 (测定精度 $\pm 0.001\text{‰}$)。按公式 (3)、(4) 计算碳同化量及碳同化速率^[29]。

$$C_T = C_{\text{SOC}} \times \left[\frac{(1000 + \delta^{13}\text{C}_{\text{labelled}}) \times R_{\text{st}}}{1000 + (1000 + \delta^{13}\text{C}_{\text{labelled}}) \times R_{\text{st}}} - \frac{(1000 + \delta^{13}\text{C}_{\text{control}}) \times R_{\text{st}}}{1000 + (1000 + \delta^{13}\text{C}_{\text{control}}) \times R_{\text{st}}} \right] \times 1000 \quad (3)$$

$$R_S = C_T \times \left[1 / \left(3.14 \times \left(\frac{D}{2} \right)^2 \right) \right] / T \quad (4)$$

式中: C_T 为样品有机碳中菌株固定的 $^{13}\text{CO}_2$ 质量分数, mg/kg; C_{SOC} 为样品有机碳质量分数, g/kg; $\delta^{13}\text{C}_{\text{labelled}}$ 为标记样品中 ^{13}C 的丰度值; $\delta^{13}\text{C}_{\text{control}}$ 为未标记样品中 ^{13}C 的丰度值; R_{st} 为碳同位素比值, $R_{\text{st}}=0.011\ 237\ 2$ ^[30]; R_S 为菌株固碳速率, $\text{mg C}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$; D 为烧杯内径, m; T 为标记时间, d。

1.7 全基因组测序及比较分析

出发菌及诱变菌基因组 DNA 的提取。将菌株接种至 5.00 mL 无碳源无机盐液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 48 h, 5 000 r/min 离心

10 min 收集菌体, 委托上海美吉生物医药科技有限公司进行全基因组测序, 采用 Illumina NovaSeq 6000 平台开展双端 150 bp 测序(测序深度 $\geq 100\times$)。采用 Fastp (v0.20.0)和 SOPA denovo (v2.04)软件进行序列质控和测序数据组装, 使用 QUAST (v5.0.2)评估组装质量。基于 GeneMarkS (v4.3)预测基因组编码序列(coding sequence, CDS), 采用 BLASTp (v2.12.0+)将预测蛋白序列与 KEGG 数据库比对, 完成基因功能注释。通过 C+G View (v2)绘制基因组圈图, 展示基因组特征元件分布。用 Mummer 软件将出发菌和诱变菌的全基因组序列进行共线性分析。

1.8 SNP 与 InDel 检测

采用 BWA (v0.7.17)将诱变菌测序读长比对至出发菌参考基因组, 经 Samtools (v1.9)处理生成 BAM 文件后, 利用 GATK (v4.2.6.1)的 HaplotypeCaller 和 VariantFiltration 模块识别 SNP 和 InDel 变异位点。

1.9 数据分析方法

实验数据采用 SPSS (v27.0.1)进行统计分析。组间差异显著性检验采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 表示差异显著; 采用 Origin (v2021)绘制柱状图等, 误差线表示 3 次生物学重复的标准偏差(SD)。

2 结果与分析

2.1 高效固碳诱变菌筛选及遗传稳定性

RubisCO 是卡尔文 (Calvin-Benson-Bassham pathway, CBB)循环途径的关键限速酶, 其活性直接影响固碳效率。本研究测定了 5 株以 CO_2 为唯一碳源的出发菌(B1-B5)的 RubisCO 酶活性(图 2A), 结果显示, 所有菌株的酶活性均 > 30 U/L, 表明其均具备良好的天然固碳潜力。值得注意的是, 由于目前 RubisCO 酶活性测定的反应体系、检测方法及活性单位尚未统一, 不同研究间数据缺乏可比性^[31-32]。因此, 本研究采用严格的内部对照策略, 在相同条件下同步测定诱

变菌株与出发菌株的酶活性, 通过横向对比客观评估诱变对固碳能力的提升效果, 以规避方法学差异导致的系统误差。如图 2A 所示, 其中 B3 (60.51 ± 2.17) U/L 与 B4 (60.32 ± 2.56) U/L 显著高于其他菌株($P < 0.05$), 表明二者具有较强的固碳代谢基础, 因此选定其作为 ARTP 诱变出发菌。

致死率与正突变率是评估 ARTP 诱变效率的核心参数。研究表明, 致死率约 95% 时可兼顾突变多样性与存活菌数量, 诱变筛选效率最优^[33-35]。为确定最佳诱变条件, 本研究测定了不同处理时间下 B3、B4 菌株的致死率(图 2B), 并分析其对应的固碳正突变率。结果显示, 处理时间与致死率呈正相关: 30 s 时致死率 $< 95\%$, 正突变率为 10.82%; 40 s 时致死率达 95%, 正突变率升至峰值 17.36%; 50 s 时致死率 $> 95\%$, 正突变率回落至 13.98%。据此确定 40 s 为最佳 ARTP 诱变处理时间。

经 ARTP 诱变及初筛, 从 B3 和 B4 诱变库中分别获得候选菌株 B3-15 与 B4-5。将菌株接种于无碳源无机盐液体培养基中培养 48 h 后测定 OD_{600} 值(图 2C)。结果表明, 候选菌株 OD_{600} 值显著高于其余诱变菌($P < 0.05$), 表明其具有良好的生长繁殖能力。

遗传稳定性是评价工程菌株应用潜力的核心指标。对候选菌株连续传代 20 次, 逐代测定 RubisCO 酶活性(图 2D)。结果表明: B3-15 在第 4 代时酶活性显著下降($P < 0.05$), 而 B4-5 连续传代 20 代后 RubisCO 酶活性仍保持稳定($P > 0.05$), 第 20 代酶活性达 (80.32 ± 2.11) U/L, 较出发菌 B4 提升 33.16%。综上所述, 确定 B4-5 为遗传稳定的高效固碳诱变菌株, 用含 20% 甘油的 LB 培养基置于 -80°C 保藏备用。

2.2 诱变菌固碳效能提升及分子机制

采用 30 d ^{13}C 同位素脉冲标记实验定量比较出发菌 B4 与诱变菌 B4-5 的碳同化能力(图 3A)。结果显示: 空白对照组(未接菌)的碳同化量(C_t)和固碳速率(R_s)分别为 (2.59 ± 0.90) mg/kg 和

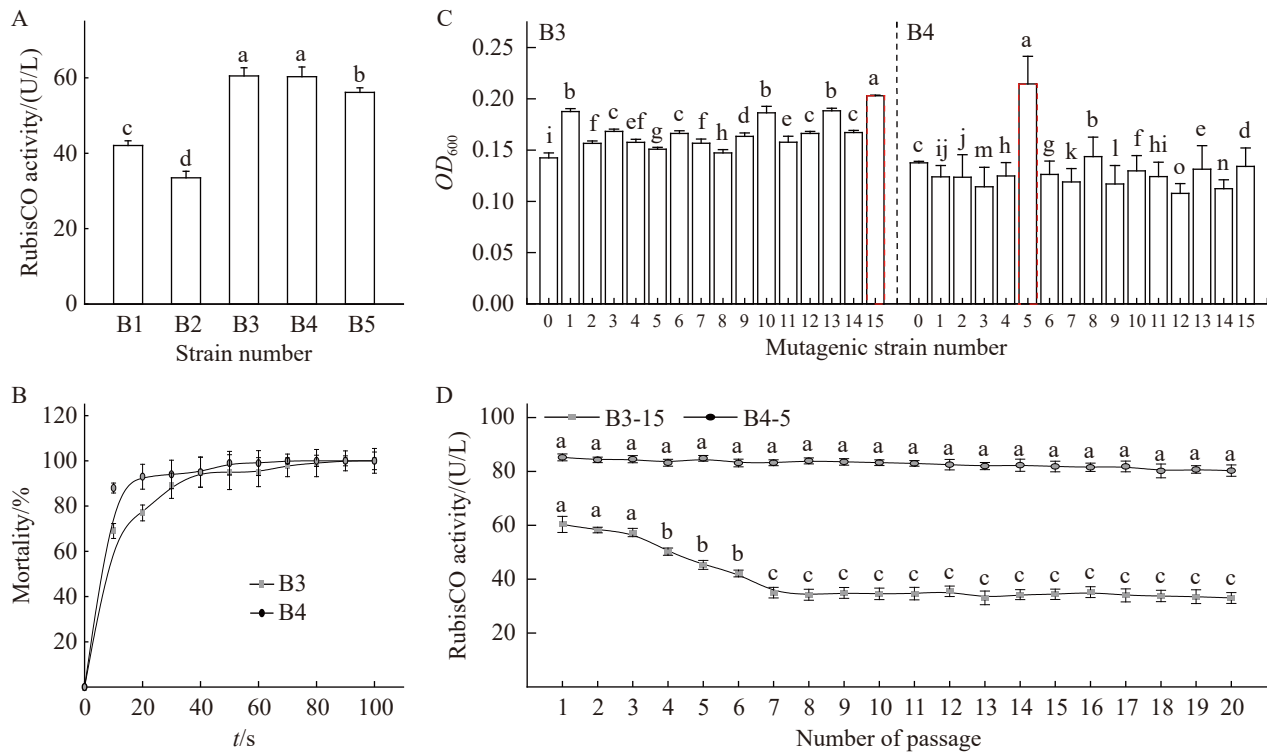


图2 固碳功能微生物ARTP诱变菌种的筛选及遗传稳定性

Figure 2 Screening and genetic stability of ARTP mutant strains with carbon fixation function. A: RubisCO activity of the parent strain; B: Death rate curves of B3 and B4 under ARTP mutagenesis; C: Comparison of OD_{600} values between mutant strains B3 and B4; D: Genetic stability of RubisCO enzyme activity in B3-15 and B4-5. Different lowercase letters indicate significant differences among groups ($P < 0.05$); The same below.

(30.60 ± 10.88) $\text{mg C}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$; 接种 B4 后, C_T 提升至 (7.32 ± 0.82) mg/kg , R_S 增至 (86.28 ± 8.89) $\text{mg C}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, 较空白组显著提升 183% 左右 ($P < 0.05$), 证实 B4 可显著增强体系固碳能力。接种 B4-5 后, C_T 与 R_S 进一步提升至 (12.63 ± 1.25) mg/kg 和 (148.93 ± 13.13) $\text{mg C}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$, 较 B4 组显著提升约 72% ($P < 0.05$), 表明 ARTP 诱变有效强化了菌株固碳表型。

为解析 B4-5 固碳效能提升的分子基础, 基于 KEGG 数据库对 B4 与 B4-5 进行全基因组功能注释, 重点比对 CBB 循环关键酶基因(图 3B)。结果表明: 两菌株 CBB 途径相关基因的数量和种类基本一致, 表明 ARTP 诱变未改变核心碳代谢通路的基因组成, 其性能提升可能源于基因序列变异导致的酶活性或转录调控改变。

CBB 途径各阶段关键基因具体注释如图 3B 所示。(1) 羧化阶段: 检出核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO, EC 4.1.1.39)单拷贝基因, 该酶为 CBB 循环限速酶, 催化 CO_2 固定的关键步骤。(2) 还原阶段: 检出磷酸甘油激酶(EC 2.7.2.3, 单拷贝)、甘油醇-3-磷酸甘油醛脱氢酶(EC 1.2.1.12, 双拷贝)等基因, 磷酸丙糖脱氢酶(EC 1.2.1.13)未检出。(3) 再生阶段: 检出转酮醇酶(EC 2.2.1.1, 双拷贝)、果酸二磷酸醛缩酶(EC 4.1.2.13, 单拷贝)等基因; 景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶(EC 3.1.3.37)及磷酸核酮糖激酶(EC 2.7.1.19)未注释到。

上述 CBB 途径关键基因的检出证实 B4 和 B4-5 均以 CBB 循环作为主要固碳途径。

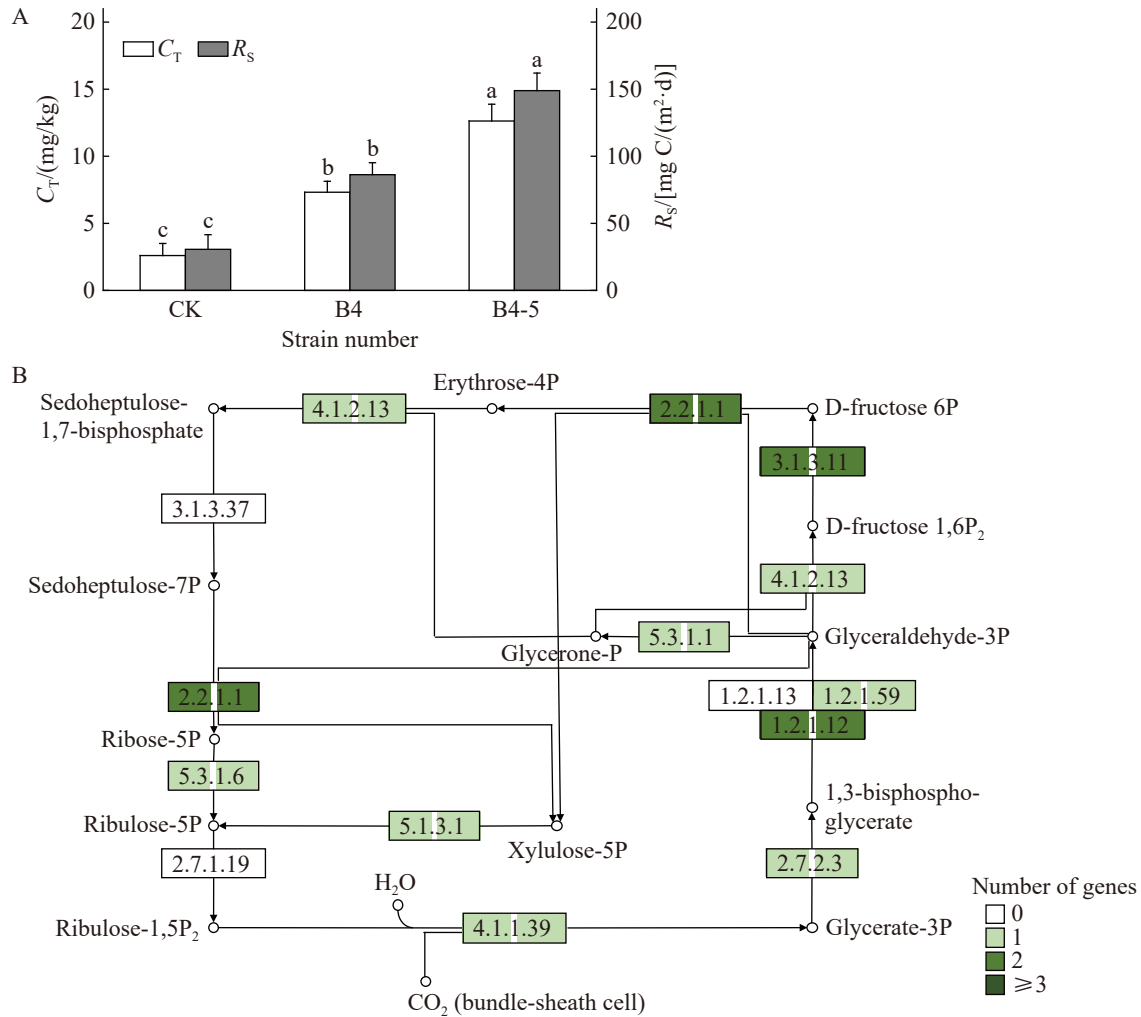


图3 出发菌B4与诱变菌B4-5的固碳效能

Figure 3 Carbon fixation efficiency of parent strain B4 and mutant B4-5. A: Comparison of carbon assimilation amount and rate; B: KEGG pathway comparison of the Calvin cycle metabolism (the color blocks on the left represent the number of labeled genes in B4, while the color blocks on the right represent the number of labeled genes in B4-5).

2.3 全基因组特征比较分析

为揭示 ARTP 诱变的遗传变异特征及 B4-5 固碳效能提升的基因组基础，采用 Illumina NovaSeq 平台对出发菌 B4 与诱变菌 B4-5 进行全基因组测序及比较基因组学分析。

基因组组装与注释结果显示(表 2)，B4 基因组为环状染色体，全长 5.44 Mb，G+C 含量 35.30%；B4-5 基因组全长 5.45 Mb，G+C 含量

表2 出发菌B4和诱变菌B4-5全基因组的一般特征

Table 2 General characteristics of the whole genome of the original strain B4 and the mutant strain B4-5

Type	B4	B4-5
Sequence length (bp)	5 441 795	5 454 960
G+C content (%)	35.30	35.30
CDS	5 392	5 392
rRNA	42	42
tRNA	107	107
sRNA	129	129

35.30%, 两者仅相差 10 kb (0.18%)。功能注释表明, 2 株菌编码序列(coding sequence, CDS)数量相同(5 392 个), 非编码 RNA 总量一致(292 个),

包括 rRNA 操纵子 14 个、tRNA 107 个和 sRNA 129 个, 基因组功能元件的数量与类型高度保守。基因组圈图(图 4A)显示, 两菌株染色体结

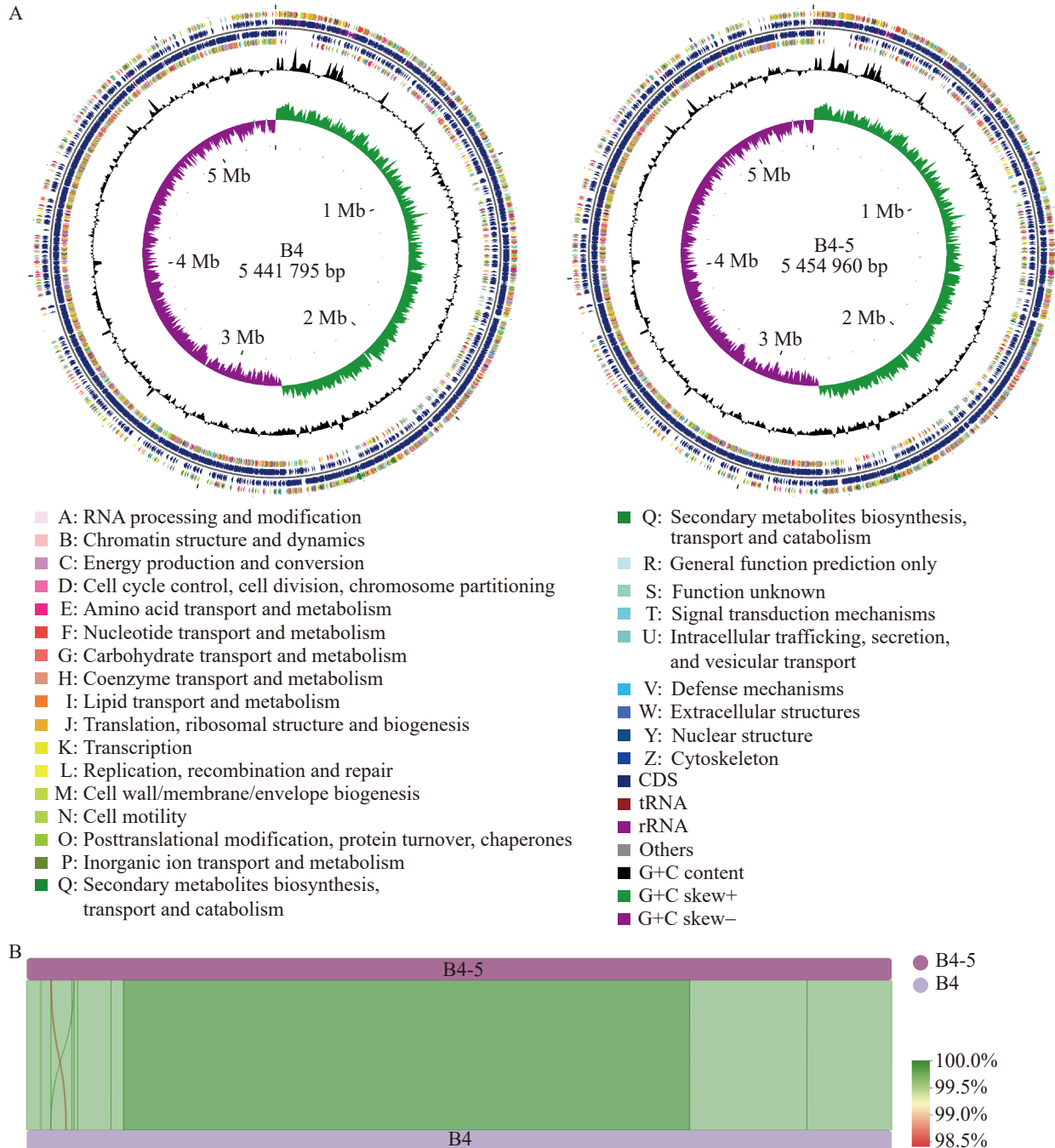


图4 出发菌B4与诱变菌B4-5基因组比较

Figure 4 Comparison of genomes between original strain B4 and mutant strain B4-5. A: Genome circle map; B: Synteny analysis.

构高度相似，功能元件在基因组上的分布位置基本一致。

全基因组共线性分析显示(图 4B)，B4 和 B4-5 基因组序列相似度达 98.50%，存在大范围连续共线性区域，未检测到染色体片段重复、倒位或易位等结构变异。上述结果表明，ARTP 诱变主要通过诱导碱基水平的点突变(SNP)和小片段插入/缺失(InDel)实现菌株性状改良，未破坏基因组整体框架。这种低频、精准的遗传变异模式既保证了遗传稳定性(与 2.1 节 B4-5 传代稳定性结果一致)，又可能通过改变关键功能基因的表达或催化效率实现固碳性能优化，是后续变异位点精准鉴定与功能解析的重要基础。

2.4 SNP 和 InDel 变异点位鉴定及功能预测

以出发菌 B4 基因组为参考序列，对诱变菌 B4-5 进行全基因组 SNP 与 InDel 变异检测(测序深度：147×，reads N50 为 8 906 bp)。经质量过滤后(图 5)，共检测到 5 个编码区非同义突变位点，分别位于 *spoIIIE* (错义突变)、*nprR* (移码突变)、*glnQ* (错义突变)、*murB* (错义突变)及 *sspH* (无义突变)(表 3)。

基于已有研究^[36]，*sspH* 基因编码小酸溶性孢子蛋白 H，其缺失或突变对菌株生长和代谢无显著影响，且与碳代谢途径无直接关联，因

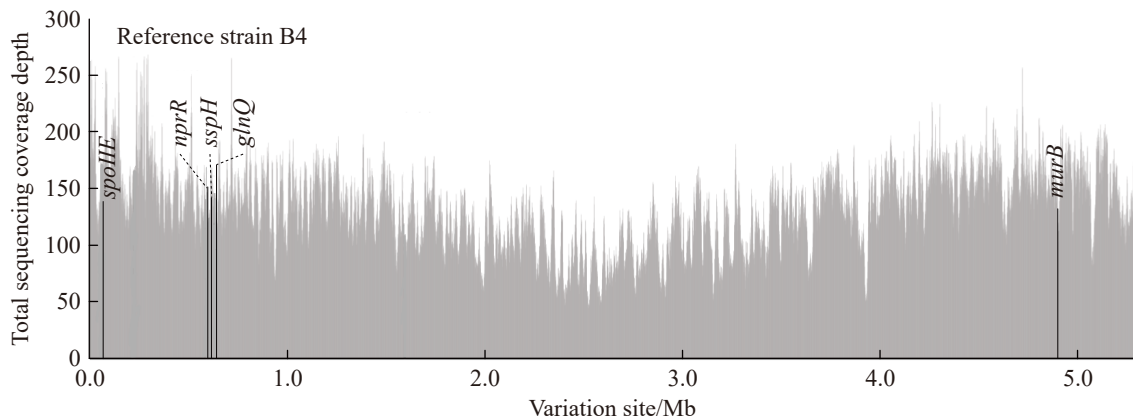


图5 基于出发菌B4鉴定诱变菌B4-5基因突变位点

Figure 5 Identification of mutant B4-5 gene mutation sites based on the original strain B4.

表3 诱变菌B4-5的基因突变位点及基因信息

Table 3 Gene mutation sites and genetic information of mutant B4-5

Number	Variation type	Gene	Mutation type	Mutation description	KO number	KO function
1	SNP	<i>spoIIIE</i>	Missense mutation	Multi-phylogenetic: stage II sporulation protein E	K06382	II sporulation protein E
2	InDel	<i>nprR</i>	Frameshift mutation	Tetrapeptide repeat protein	K20480	HTH-type transcription factor, quorum sensing regulator NprR
3	SNP	<i>glnQ</i>	Missense mutation	Amino acid ABC transporter ATP binding protein	K10041	Aspartate/glutamate complex transport system ATP binding protein
4	SNP	<i>murB</i>	Missense mutation	UDP- <i>N</i> -acetylmuramic acid dehydrogenase	K00075	UDP- <i>N</i> -acetylmuramic acid dehydrogenase
5	SNP	<i>sspH</i>	Non-sense mutation	Acid-soluble spore protein H	K06425	Small molecule acid-soluble spore protein H

此排除其对固碳性能的贡献。其余 4 个突变基因(*spoIIIE*、*nprR*、*glnQ*、*murB*)分别参与孢子形成^[37]、群体感应调控^[38]、氨基酸转运^[39]和细胞壁肽聚糖合成^[40]等关键生理过程,推测其协同突变可能是 B4-5 固碳提升的分子基础。

功能注释表明(表 3), *spoIIIE* 参与孢子形成信号转导蛋白,参与芽孢形成调控,可能通过优化碳源分配提高固碳效率;*nprR* 参与群体感应效应途径,调控菌群密度依赖性基因表达;*glnQ* 编码 ABC 转运蛋白复合体的 ATP 结合亚基,参与谷氨酰胺等氨基酸转运,可能协同碳氮代谢平衡;*murB* 参与核苷酸糖生物合成和核苷酸糖代谢,可能通过强化细胞壁合成重编程碳流分配。上述基因的协同突变可能构成“代谢调控-碳流优化-固碳增强”的多层次调控网络。

3 讨论

3.1 ARTP 诱变强化固碳新能的表型特征

本研究采用 ARTP 诱变技术对出发菌 B4 进行定向改良,成功筛选获得遗传稳定且固碳性能显著提升的诱变菌 B4-5,解决了天然固碳微生物普遍存在的核心固碳酶 RubisCO 活性不足导致固碳效率低下,以及优良性状易退化导致遗传稳定性差等问题。其核心表型优势体现在:(1) 关键固碳酶 RubisCO 活性较出发菌 B4 提高 33.16%,直接反映碳固定潜力的增强;(2) 该高活性性状在连续 20 代传代培养中保持稳定($P>0.05$),未出现活性衰减。遗传稳定性是菌株工业化应用的重要前提,可有效规避实际应用中因性状退化导致的效能波动,为规模化生物碳捕集提供可靠的功能菌种资源。

¹³C 同位素标记实验进一步验证了 B4-5 的固碳效能提升。相较于出发菌 B4, B4-5 的碳同化量与固碳速率显著增强。 R_s 的提升可有效缩短生物固碳工艺周期、降低运行成本。从分子机制角度分析, RubisCO 作为 CBB 循环的限速酶,其活性提升是驱动 B4-5 固碳性能强化的直

接酶学基础,表明 ARTP 诱变成功实现了 CBB 循环核心功能酶的定向优化。

全基因组功能注释显示, B4 和 B4-5 均完整保留 CBB 循环关键酶编码基因,包括限速酶 RubisCO (EC 4.1.1.39)、果糖-1,6-二磷酸酶(EC 3.1.3.11)及转酮醇酶(EC 2.2.1.1)等,与已有研究结论一致^[41-43]。上述酶分别催化 CO₂ 固定、磷酸糖还原和核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)再生等关键步骤^[44-47]。重要的是,两菌株 CBB 循环核心基因的数量及序列未检测到显著变异,表明 ARTP 诱变未破坏 CBB 循环碳固定途径的结构完整性,同时排除了 CBB 循环基因本身的突变作为固碳性能提升的直接原因。这一结果与 Lewis 等^[48]在固氮领域的研究发现相呼应:*Rhodospseudomonas palustris* 的固氮能力提升源于非固氮途径关键基因突变,通过代谢路径重定向为固氮酶高效供能。类比该机制, B4-5 菌株的固碳性能提升可能源于非 CBB 循环途径基因的突变,如碳代谢流分配、能量供应或辅因子合成相关基因^[49-51],这些遗传变异通过优化代谢网络协同性间接提升了 CBB 循环运行效率。该推论为后续鉴定固碳效能调控的关键靶点指明了方向。

3.2 遗传稳定性的基因组学基础

为解析 B4-5 高效固碳表型的遗传稳定性机制,采用全基因组测序开展比较基因组学分析。结果显示, B4 和 B4-5 基因组结构高度保守:两者均为环状染色体, G+C 含量相同(35.30%),编码序列(5 392 个)及非编码 RNA 数量(292 个)一致,功能元件在染色体上的分布位置基本重合(图 4A)。全基因组共线性分析(图 4B)显示,匹配区域占基因组总长度的 98.50%,未检测到>1 kb 的染色体片段缺失、重复或倒位等大规模结构变异。

基因组高度保守性对诱变菌遗传稳定性具有重要意义。已有研究表明,微生物基因组大规模结构变异(如大片段插入/缺失、染色体重排)常导致代谢网络紊乱和遗传不稳定^[9]。传统化学

诱变(如 EMS、NTG)会导致大量随机突变和基因组重排^[52],使诱变菌在传代过程中发生遗传漂移^[9]。相比之下,ARTP 诱变主要通过低温等离子体诱导碱基水平的点突变(SNP)和小片段插入/缺失(InDel),基因组整体框架保持完整。这与 B4-5 连续 20 代传代后 RubisCO 酶活性保持稳定($P>0.05$)的表型结果相一致,证实基因组结构完整性是表型稳定遗传的关键分子基础。

此外,基因组高度保守性为精准定位固碳性能调控关键位点提供了重要前提。在排除大规模结构变异的干扰后,B4-5 固碳表型改良的分子驱动因素可聚焦于局部点突变。已有研究证实^[53-54],单个或少数 SNP 位点的变异可通过改变酶活性、底物亲和力或基因表达调控显著提升菌株代谢性能。因此,后续研究可通过 SNP/InDel 精准定位、突变位点功能验证及代谢

网络分析,系统解析“基因组微变异→代谢流重构→固碳性能提升”的分子机制,为理性设计高效固碳工程菌提供理论依据。

3.3 关键突变基因的功能解析及固碳强化机制

基因组变异分析鉴定出 4 个关键非同义突变基因: *spoIIE*、*nprR*、*glnQ* 及 *murB*。值得注意的是,这些基因均不属于 CBB 循环核心基因,却与固碳性能显著提升相关联。这表明微生物固碳能力的优化不仅依赖于 CBB 途径本身,还受代谢网络协同调控的影响。基于基因功能注释与现有研究,提出以下可能的调控机制(图 6)。

3.3.1 孢子形成调控与碳源分配优化

spoIIE 与 *nprR* 均参与菌株孢子形成调控: *spoIIE* 编码不对称分裂调控蛋白,参与孢子形成

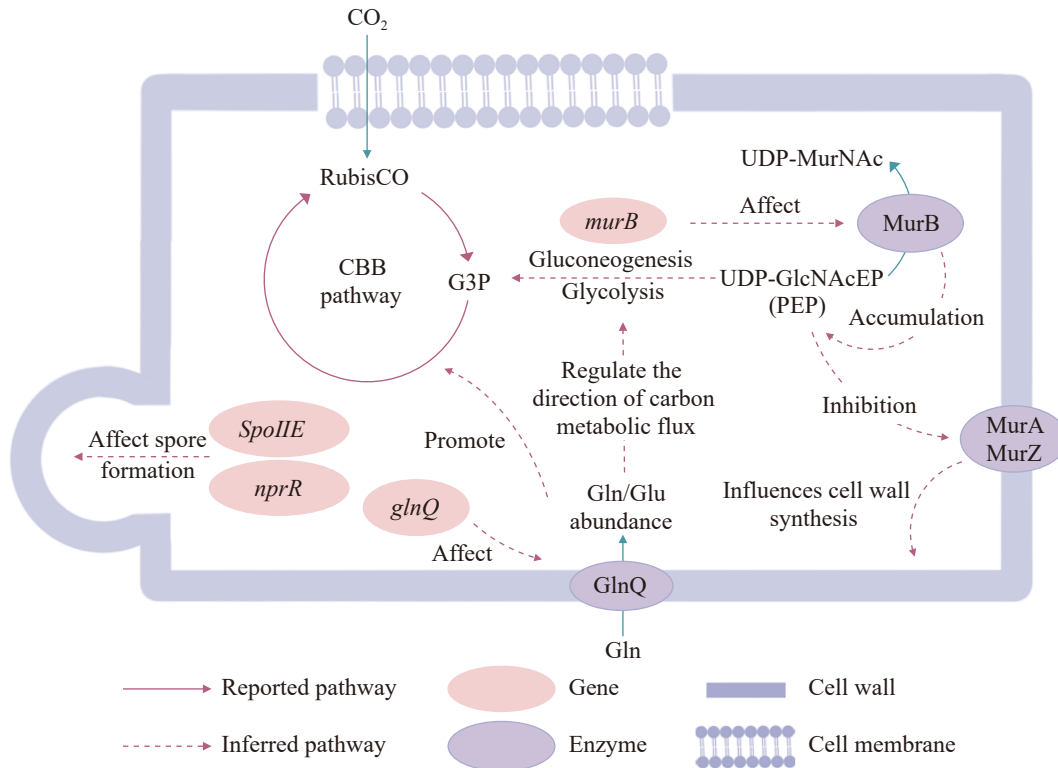


图6 诱变菌B4-5突变位点对卡尔文固碳途径的影响机制示意图

Figure 6 The mechanism of the effect of the mutation site of the mutant B4-5 on the Calvin carbon fixation pathway.

起始复合物组装^[55]; *nprR* 作为群体感应受体, 通过信号转导调控孢子形成时序^[38,56]。孢子形成是能量密集型过程, 需消耗大量 ATP 和碳骨架用于保护性蛋白和细胞壁合成^[51]。两基因突变可能通过以下途径影响固碳(图 6): (1) 降低孢子形成倾向, 减少碳源向休眠孢子合成的分流; (2) 延长营养生长期, 使细胞维持高代谢活性状态时间延长。推测该机制使 B4-5 在相同培养周期内积累更多生物量, 间接提升总碳同化总量。然而, 具体的碳流分配比例和代谢状态变化需通过 ¹³C 代谢通量分析和转录组学进一步验证。

3.3.2 碳氮代谢偶联与前体物质供应

glnQ 编码谷氨酰胺 ABC 转运系统的 ATP 结合亚基(GlnQ), 通过 ATP 水解驱动谷氨酰胺跨膜摄取, 是氮源同化的重要步骤^[57-58]。已有研究表明, *glnQ* 或其同源基因的突变可导致谷氨酰胺摄取能力下降并扰动胞内氮代谢状态, 进而影响细菌生长及多种代谢过程^[58]。Gln/Glu 比值是反映细胞氮营养状态的重要代谢信号, 通过谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶(GS-GOGAT) 循环与中心碳代谢相耦联^[57]; 研究表明^[59], 氮源和碳源/能量供应可显著调控该循环, 改变糖酵解、三羧酸循环等路径的碳流分配, 表明氮同化与碳代谢的紧密联动关系。此外, ABC 转运蛋白的 ATP 结合域直接决定能量偶联和底物转运效率, 其结构变化通常导致转运活性及代谢稳态的明显改变^[60]。因此, 本研究中位于 ATP 结合域附近的 *glnQ* 突变可能通过调节谷氨酰胺转运效率和胞内 Gln/Glu 平衡, 优化碳氮代谢协调性。结合氮源充足时碳更倾向流向生长和固碳、而氮限制促使碳用于储能物质合成的规律^[61-62], 该突变最终可能促进更多碳流向 CBB 循环分配(图 6)。

3.3.3 肽聚糖合成与代谢流重编程

murB 编码 UDP-N-乙酰烯醇丙酮酸葡萄糖胺还原酶(MurB), 催化肽聚糖前体 UDP-MurNAc 的合成, 是肽聚糖生物合成的关键酶^[40,63]。本研究中 *murB* 突变位于酶活性中心附近, 可能影

响催化效率。肽聚糖合成与中心碳代谢密切相关: 前体 UDP-GlcNAc 来源于糖酵解中间产物果糖-6-磷酸, 而 MurA 催化步骤消耗磷酸烯醇丙酮酸(PEP)。 *murB* 突变可能通过以下途径间接影响固碳(图 6): (1) 改变肽聚糖合成速率, 影响 PEP 等中心代谢物的分配; (2) 通过代谢物反馈调节, 影响糖酵解-糖异生平衡。然而, *murB* 突变如何定量影响代谢流分配、是否直接关联 CBB 循环活性, 仍需通过代谢组学和 ¹³C 同位素示踪实验进一步阐明。

3.3.4 多基因协同调控网络

综上所述, B4-5 固碳能力的显著提升源于多个非 CBB 途径基因的协同突变: *spoIIIE* 与 *nprR* 可能通过调控细胞生理状态延长固碳活跃期; *glnQ* 优化碳氮代谢平衡; *murB* 可能通过中心代谢重编程影响碳源分配(图 6)。这种“外围基因调控核心通路”的模式揭示了微生物固碳能力优化的系统性和复杂性, 为设计高效固碳工程菌提供了新思路。

需指出的是, 上述机制推测主要基于基因功能注释和已有文献, B4-5 中具体的分子机制仍需进一步验证。后续研究可通过以下策略深入解析: (1) 转录组学分析, 比较 B4 和 B4-5 的全局基因表达差异; (2) 代谢组学检测, 定量分析关键代谢物(PEP、G3P、Gln、Glu 等)浓度变化; (3) ¹³C 代谢通量分析, 解析碳流在不同代谢途径间的分配比例; (4) 基因回补实验, 验证各突变基因对固碳性能的独立贡献。通过系统整合多组学数据, 可构建“基因变异-代谢重构-表型强化”的完整调控网络, 为微生物固碳功能强化提供理论指导。

4 结论

(1) 采用 ARTP 诱变技术成功筛选获得高效固碳突变 B4-5, 其 RubisCO 活性较出发菌 B4 提高 33.16%, 连续传代 20 代后酶活性保持稳定 ($P>0.05$), 表现出良好的遗传稳定性。¹³C 同位素标记实验显示, B4-5 的碳同化量与固碳速率

分别较 B4 提升 72.54% 和 72.61%。全基因组注释显示, 2 株菌均完整保留了 CBB 循环关键酶编码基因, 证实其依赖 CBB 途径实现 CO₂ 固定。

(2) 全基因组比较分析表明, B4 与 B4-5 基因组高度保守, 序列相似度>98.50%, 未检测到大规模染色体重排及片段缺失/重复等结构变异, 且连续 20 代传代数据显示 RubisCO 酶活性无显著差异($P>0.05$), 表明突变株的遗传背景稳定, 为其固碳相关表型的遗传稳定性提供了分子支撑。

(3) 基因组变异分析鉴定出 4 个关键非同义突变基因(*spoIIIE*、*nprR*、*glnQ*、*murB*), 均不直接参与 CBB 循环但与固碳性能提升显著相关。功能分析提示, 上述基因可能通过调控孢子形成、优化碳氮代谢平衡及影响肽聚糖合成等途径, 协同提升 CBB 循环运行效率。本研究揭示了“外围基因调控核心通路”的固碳强化模式, 为微生物固碳功能定向改良提供了理论依据和技术参考。

作者贡献声明

彭梓怡: 数据分析、撰写文章; 宋佳宇: 课题执行、修订文章; 袁野: ARTP 诱变实验; 陈姝畅: 酶活测定实验; 付爱民: 同位素示踪实验; 任金蔓: 高效固碳菌筛选实验; 张华: 执行调研; 李兴春: 项目管理; 刘玉龙: 数据收集与监管; 吴百春: 监督管理; 王庆宏: 软件程序; 陈春茂: 实验指导。

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] 谭景焯, 王军, 毛慧琴, 王恒茂, 刘志强, 王美蓉, 阎然, 王训梅, 江飞. 净零排放对中国大气二氧化碳浓度的影响: 基于 GEOS-Chem 模型的理想模拟[J]. 中国科学: 地球科学, 2025, 55(3): 892-907.
Tan JY, Wang J, Mao HQ, Wang HM, Liu ZQ, Wang MR, Yan R, Wang XM, Jiang F. Impact of net-zero emissions on atmospheric CO₂ concentration in China: ideal simulations based on the GEOS-Chem model[J]. *Scientia Sinica (Terrae)*, 2025, 55(3): 892-907 (in Chinese).
- [2] Han XX, Hu XF, Yin QR, Li SH, Song CF. Intensification of brewery wastewater purification integrated with CO₂ fixation via microalgae co-cultivation[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(4): 105710.
- [3] 许小明, 张晓萍, 王浩嘉, 贺洁, 王妙倩, 易海杰, 薛帆, 邹亚东, 田起隆, 何亮. 黄土高原子午岭植被自然恢复下的固碳特征[J]. 环境科学, 2023, 44(5): 2756-2766.
Xu XM, Zhang XP, Wang HJ, He J, Wang MQ, Yi HJ, Xue F, Zou YD, Tian QL, He L. Carbon sequestration characteristics under natural vegetation restoration in Ziwuling area of the Loess Plateau[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(5): 2756-2766 (in Chinese).
- [4] Zeng J, Wang ZJ, Chen GB. Biological characteristics of energy conversion in carbon fixation by microalgae[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 152: 111661.
- [5] Shukla PR, Skea J, Slade R, Fradera R, Pathak M, Khourdajie AA, Belkacemi M, Diemen RV, Hasija A, Lisboa G, Luz S, Malley J, Mccollum D, Some S, Vyas P. Climate change 2022: mitigation of climate change[C]// Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2022: 1-979.
- [6] 周连玉, 巨家升, 马学兰, 孙文娟, 王龙瑞, 魏乐. 农田土壤自养微生物固碳潜力及影响因素的研究进展[J]. 山东农业科学, 2023, 55(6): 157-165.
Zhou LY, Ju JS, Ma XL, Sun WJ, Wang LR, Wei L. Research progress of carbon sequestration potential of autotrophic microorganisms in farmland soil and influencing factors[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2023, 55(6): 157-165 (in Chinese).
- [7] 刘洋炎, 王尚, 厉舒祯, 邓晔. 基于功能基因的微生物碳循环分子生态学研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(7): 1676-1689.
Liu YY, Wang S, Li SZ, Deng Y. Advances in molecular ecology on microbial functional genes of carbon cycle[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(7): 1676-1689 (in Chinese).
- [8] Prywes N, Phillips NR, Oltrogge LM, Lindner S, Taylor-Kearney LJ, Tsai YC, de Pins B, Cowan AE, Chang HA, Wang RZ, Hall LN, Bellieny-Rabelo D, Nisonoff HM, Weissman RF, Flamholz AI, Ding D, Bhatt AY, Mueller-Cajar O, SHIH PM, MILO R, et al. A map of the rubisco biochemical landscape[J]. *Nature*, 2025, 638(8051): 823-828.
- [9] Darmon E, Leach DRF. Bacterial genome instability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, 78(1): 1-39.
- [10] Li ZY, Lanster DL, Badran AH. Synthetic approaches to enhance biological carbon capture[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2025, 95: 103350.
- [11] Ruan SP, Jiang YC, Wang AX, Zhang XY, Lin Y, Liang

- SL. Carbon sequestration pathways in microorganisms: advances, strategies, and applications[J]. *Engineering Microbiology*, 2025, 5(2): 100196.
- [12] Zhang X, Zhang XF, Li HP, Wang LY, Zhang C, Xing XH, Bao CY. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387-5396.
- [13] Zhang Q, Miao RY, Feng RC, Yan JJ, Wang T, Gan Y, Zhao J, Lin JB, Gan BC, Zhang Q, Miao RY, Feng RC, Yan JJ, Wang T, Gan Y, Zhao J, Lin JB, Gan BC. Application of atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) to microbial breeding[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(8): 6466-6484.
- [14] Li YH, Juo JJ, Ng IS. Current breakthroughs and advances in atmospheric room temperature plasma (ARTP) technology for biomanufacturing[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2025, 12(1): 63.
- [15] Ruan JY, Xie H, Zheng YL, Zhao QW, Chen XN, Lyu ZY, Li YQ. Improving fidaxomicin production through ARTP mutagenesis and fermentation optimization in *Actinoplanes deccanensis*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2025, 10(4): 1098-1106.
- [16] Xiong Z, Chen XD, Zou ZP, Peng LX, Zou L, Liu BL, Li Q. Improving efficiency of bacterial degradation of polyethylene microplastics using atmospheric and room temperature plasma mutagenesis[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 418: 131930.
- [17] 陆欢, 沈玲, 尚晓冬, 刘建雨, 王瑞娟, 杨慧. 常压室温等离子体技术在微生物诱变育种中的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2023, 40(4): 92-97.
- Lu H, Shen L, Shang XD, Liu JY, Wang RJ, Yang H. Application of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis in microbial and edible fungi mutation breeding[J]. *Journal of Biology*, 2023, 40(4): 92-97 (in Chinese).
- [18] 刘子龙, 崔皓然, 潘韵, 王智文, 陈涛. 室温常压等离子体技术在菌株耐受性改造中的应用与研究进展[J]. *化工进展*, 2026, 45(3): 1721-1732.
- Liu ZL, Cui HR, Pan Y, Wang ZW, Chen T. Applications and research progress of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis in strain tolerance improvement[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2026, 45(3): 1721-1732 (in Chinese).
- [19] Wang J, Li X, Wang JF, Wei W, Jin WJ, Zhou LB. Comparative proteomics reveals energy and carbon metabolism changes in *Scenedesmus quadricauda* mutants induced by heavy-ion beam irradiation[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 406: 130965.
- [20] Dronsella B, Orsi E, Schulz-Mirbach H, Benito-Vaquerizo S, Yilmaz S, Glatter T, Bar-Even A, Erb TJ, Claassens NJ. One-carbon fixation *via* the synthetic reductive glycine pathway exceeds yield of the Calvin cycle[J]. *Nature Microbiology*, 2025, 10(3): 646-653.
- [21] Gao L, Liu L, Lv AP, Fu L, Lian ZH, Nunoura T, Hedlund BP, Xu QY, Wu D, Yang J, Ali M, Li MM, Liu YH, Antunes A, Jiang HC, Cheng L, Jiao JY, Li WJ, Fang BZ. Reversed oxidative TCA (roTCA) for carbon fixation by an *Acidimicrobiia* strain from a saline lake[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrae147.
- [22] 王浩然, 张礼霞, 高平, 李大平. 一株具有氢自养能力的固氮粘质沙雷氏菌的分离鉴定、代谢特征与功能基因检测[J]. *应用与环境生物学报*, 2024, 30(1): 158-166.
- Wang HR, Zhang LX, Gao P, Li DP. Isolation, identification, metabolic characteristics, and functional gene detection of a nitrogen-fixing strain with hydrogen autotrophic ability of *Serratia marcescens*[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2024, 30(1): 158-166 (in Chinese).
- [23] 郭珺, 樊芳芳, 王立革, 武爱莲, 郑军. 固碳微生物菌株的分离鉴定及其固碳能力测定[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(1): 90-97.
- Guo J, Fan FF, Wang LG, Wu AL, Zheng J. Isolation, identification of carbon-fixing bacteria and determination of their carbon-fixing abilities[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(1): 90-97 (in Chinese).
- [24] 生态环境部. 土壤pH值的测定 电位法: HJ 962—2018[S]. 北京: 中国环境出版社, 2018.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Soil-determination of pH-potentiometry: HJ 962—2018[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2018 (in Chinese).
- [25] 环境保护部. 土壤质量 全氮的测定 凯氏法: HJ 717—2014[S]. 北京: 中国环境出版社, 2014.
- Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Soil quality-determination of total nitrogen-modified Kjeldahl method: HJ 717—2014[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2014 (in Chinese).
- [26] 环境保护部. 土壤 总磷的测定 碱熔-钼锑抗分光光度法: HJ 632—2011[S]. 北京: 中国环境出版社, 2011.
- Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Soil-determination of total phosphorus by alkali fusion-Mo-Sb anti spectrophotometric method: HJ 632—2011[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2011 (in Chinese).
- [27] 环境保护部. 土壤 有机碳的测定 重铬酸钾氧化—分光光度法: HJ 615—2011[S]. 北京: 中国环境出版社, 2011.
- Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Soil-determination of organic carbon-potassium dichromate oxidation spectrophotometric method: HJ 615—2011[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2011 (in Chinese).
- [28] 生态环境部. 土壤和沉积物 石油烃(C10—C40)的测定 气相色谱法: HJ 1021—2019[S]. 北京: 中国环境出版社, 2019.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Soil and sediment-determination of petroleum hydrocarbons (C10—C40)-gas chromatography: HJ 1021—2019[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2019 (in Chinese).
- [29] 宋佳宇, 彭梓怡, 李兴春, 付爱民, 任金蔓. 含油固废残

- 渣中微生物群落结构及固碳能力[J]. 环境科学与技术, 2024, 47(10): 84-96.
- Song JY, Peng ZY, Li XC, Fu AM, Ren JM. Microbial community structure and carbon sequestration capacity in oily solid waste residue[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 47(10): 84-96 (in Chinese).
- [30] 孟缘, 付心雨, 鞠吉东, 周冰谦, 卢恒, 王晓, 郭兰萍, 刘伟. 基于¹³C同位素标记法探究连作对丹参生长及光合碳分配的影响[J]. 山东农业科学, 2024, 56(2): 95-103.
- Meng Y, Fu XY, Ju JD, Zhou BQ, Lu H, Wang X, Guo LP, Liu W. Effects of continuous cropping on growth and photosynthetic carbon distribution of *Salvia miltiorrhiza* based on ¹³C isotope labeling[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2024, 56(2): 95-103 (in Chinese).
- [31] Li XY, Huang R, Wang Y, Jiang H, Luo YL, Wang CQ, Li B. Straw application promotes soil carbon storage by affecting aggregate-associated bacterial community structure and RuBisCO activity: a 35-year field experiment[J]. *Microbiology Spectrum*, 2025, 13(9): e00088-25.
- [32] Sun YQ, Chen TY, Ge XW, Ni T, Dykes GF, Zhang PJ, Huang F, Liu LN. Engineering CO₂-fixing modules in *Escherichia coli* via efficient assembly of cyanobacterial Rubisco and carboxysomes[J]. *Plant Communications*, 2025, 6(3): 101217.
- [33] 闫更轩, 刘伟, 刘春燕, 田缘, 于冲, 姜威, 田洁萍, 张淑梅. ARTP诱变选育高产腺苷菌株及发酵条件优化[J]. 中国调味品, 2024, 49(8): 63-68.
- Yan GX, Liu W, Liu CY, Tian Y, Yu C, Jiang W, Tian JP, Zhang SM. Breeding of high-producing adenosine strains by ARTP mutation and optimization of fermentation conditions[J]. *China Condiment*, 2024, 49(8): 63-68 (in Chinese).
- [34] Cao S, Zhou X, Jin WB, Wang F, Tu RJ, Han SF, Chen HY, Chen C, Xie GJ, Ma F. Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(Pt 2): 1400-1406.
- [35] 陈艳彬, 支梦涛, 白变霞, 贾瑞, 任嘉红. 常温常压等离子体诱变选育荧光假单胞菌 CLW17 高效促生长突变株[J]. 中国农学通报, 2025, 41(33): 131-138.
- Chen YB, Zhi MT, Bai BX, Jia R, Ren JH. Breeding of highly efficient growth-promoting mutant strain of *Pseudomonas fluorescens* CLW17 by atmospheric and room temperature plasma[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2025, 41(33): 131-138 (in Chinese).
- [36] Cabrera-Hernandez A, Sanchez-Salas JL, Paidhungat M, Setlow P. Regulation of four genes encoding small, acid-soluble spore proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Gene*, 1999, 232(1): 1-10.
- [37] Levdikov VM, Blagova EV, Rawlings AE, Jameson K, Tunaley J, Hart DJ, Barak I, Wilkinson AJ. Structure of the phosphatase domain of the cell fate determinant SpoIIE from *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 415(2): 343-358.
- [38] Rocha J, Flores V, Cabrera R, Soto-Guzmán A, Granados G, Juaristi E, Guarneros G, deLa Torre M. Evolution and some functions of the NprR-NprRB quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(4): 1069-1078.
- [39] Satomura T, Shimura D, Asai K, Sadaie Y, Hirooka K, Fujita Y. Enhancement of glutamine utilization in *Bacillus subtilis* through the GlnK-GlnL two-component regulatory system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(14): 4813-4821.
- [40] Benson TE, Marquardt JL, Marquardt AC, Etkorn FA, Walsh CT. Overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-*N*-acetylenolpyruvylglucosamine reductase[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(8): 2024-2030.
- [41] Zhu XG, de Sturler E, Long SP. Optimizing the distribution of resources between enzymes of carbon metabolism can dramatically increase photosynthetic rate: a numerical simulation using an evolutionary algorithm[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(2): 513-526.
- [42] 李春荣, 张馨, 刘翠敏. 光合作用碳反应核心-卡尔文循环及调控[J/OL]. 生命科学, 2024 (2024-03-29). <https://link.cnki.net/urlid/31.1600.Q.20240328.1659.004>.
- Li CR, Zhang X, Liu CM. Regulation of the Calvin-Benson-Bassham cycle[J/OL]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2024 (2024-03-29). <https://link.cnki.net/urlid/31.1600.Q.20240328.1659.004> (in Chinese).
- [43] 周灵, 王晓丽, 曹子林, 敖艳婷, 姚晓蝶. 基于KEGG千针万线草光合代谢通路分析[J]. 现代农业科技, 2023(4): 57-61.
- Zhou L, Wang XL, Cao ZL, Ao YT, Yao XD. Analysis of photosynthetic metabolism pathways of *Stellaria yunnanensis* based on KEGG[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2023(4): 57-61 (in Chinese).
- [44] 张芮, 高金伟, 姜青青, 王钰晴, 张丹, 周文礼. 低温对小球藻固碳效能的影响及转录组学分析[J]. 天津农学院学报, 2025, 32(3): 1-7.
- Zhang R, Gao JW, Jiang QQ, Wang YQ, Zhang D, Zhou WL. Physiological response and transcriptomic analysis of *Chlorella vulgaris* to cold stress[J]. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2025, 32(3): 1-7 (in Chinese).
- [45] Calvin M, Benson AA. The path of carbon in photosynthesis[J]. *Science*, 1948, 107(2784): 476-480.
- [46] Benson A, Calvin M. The dark reductions of photosynthesis[J]. *Science*, 1947, 105(2738): 648-649.
- [47] Khozaei M, Fisk S, Lawson T, Gibon Y, Sulpice R, Stitt M, Lefebvre SC, Raines CA. Overexpression of plastid transketolase in tobacco results in a thiamine auxotrophic phenotype[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(2): 432-447.
- [48] Lewis NM, Sarne A, Fixen KR. Evolving a new electron transfer pathway for nitrogen fixation uncovers an electron bifurcating-like enzyme involved in anaerobic aromatic compound degradation[J]. *mBio*, 2023, 14(1): e02881-22.
- [49] 曾雪霞. 蓝细菌光驱固碳合成葡萄糖细胞工厂的升级[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022.

- Zeng XX. Upgrade of cell factory for photoinduced synthesis of glucose by cyanobacteria[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2022 (in Chinese).
- [50] Antonovsky N, Gleizer S, Noor E, Zohar Y, Herz E, Barenholz U, Zelbuch L, Amram S, Wides A, Tepper N, Davidi D, Bar-On Y, Bareia T, Wernick DG, Shani I, Malitsky S, Jona G, Bar-Even A, Milo R. Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 115-125.
- [51] Guo LY, Chen Y, He ZY, Wang ZJ, Chen QM, Chen J, Oz F, Xu ZM, Zeng MM. Genomic and transcriptomic analysis of mutant *Bacillus subtilis* with enhanced nattokinase production via ARTP mutagenesis[J]. *Foods*, 2025, 14(5): 898.
- [52] Lawrence CW. Classical Mutagenesis Techniques[M]. New York: Academic Press, 2002, 189-199.
- [53] My R, Gupte AP, Bizzotto E, Frizzarin M, Antoniali P, Campanaro S, Favaro L. Unveiling the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* strains for lignocellulosic bioethanol: a genomic exploration through fermentation stress tests[J]. *New Biotechnology*, 2025, 85: 63-74.
- [54] Hubmann G, Foulquié-Moreno MR, Nevoigt E, Duitama J, Meurens N, Pais TM, Mathé L, Saerens S, Nguyen HTT, Swinnen S, Verstrepen KJ, Concilio L, de Troostembergh JC, Thevelein JM. Quantitative trait analysis of yeast biodiversity yields novel gene tools for metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 17: 68-81.
- [55] Carniol K, Ben-Yehuda S, King N, Losick R. Genetic dissection of the sporulation protein SpoIIIE and its role in asymmetric division in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(10): 3511-3520.
- [56] Perchat S, Talagas A, Poncet S, Lazar N, Li deLa Sierra-Gallay I, Gohar M, Lereclus D, Nessler S. How quorum sensing connects sporulation to necrotrophism in *Bacillus thuringiensis*[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(8): e1005779.
- [57] Han M, Xu MY, Su T, Wang SZ, Wu LD, Feng JH, Ding CJ. Transcriptome analysis reveals critical genes and pathways in carbon metabolism and ribosome biogenesis in poplar fertilized with glutamine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9998.
- [58] Tamura GS, Nittayajarn A, Schoentag DL. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(6): 2877-2885.
- [59] Schulz AA, Collett HJ, Reid SJ. Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(2): 361-367.
- [60] Ford RC, Beis K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(1): 23-36.
- [61] Rädicker N, Escrig S, Spangenberg JE, Voolstra CR, Meibom A. Coupled carbon and nitrogen cycling regulates the cnidarian-algal symbiosis[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6948.
- [62] Liu XC, Lin XH, Liu SC, Zhu CQ, Grierson D, Li SJ, Chen KS. The effect of NH₄⁺ on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression, metabolic flux and citrate content of citrus juice sacs[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 167: 123-131.
- [63] Rowland SL, Errington J, Wake RG. The *Bacillus subtilis* cell-division 135–137 degrees region contains an essential *orf* with significant similarity to *murB* and a dispensable *sbp* gene[J]. *Gene*, 1995, 164(1): 113-116.