

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(3): 395-399; 4 March 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株产 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶的氢氧化细菌的分离鉴定及酶活力测定

付博¹, 王卫卫^{1*}, 唐明², 陈兴都³

(¹ 西北大学 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

(² 西北农林科技大学林学部, 杨凌 712100)

(³ 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055)

摘要 【目的】以结瘤豆科植物紫花苜蓿根际土壤为研究材料, 筛选具有 ACC 脱氨酶活力的氢氧化细菌, 探索氢氧化细菌植物促生作用机制。【方法】利用持续通 H₂ 的气体循环培养体系、矿质盐固体培养基, 分离、培养氢氧化细菌, 观察菌株形态并测定生理生化特征; 16S rDNA 序列分析法构建系统发育树; 采用薄层层析法筛选 ACC 脱氨酶阳性菌株, 茚三酮显色法测定 ACC 脱氨酶活力。【结果】分离的 37 株细菌中有 8 株菌氧化氢和自养生长能力较强, 初步确定为氢氧化细菌, 从中筛选出 1 株 ACC 脱氨酶阳性菌株 WMQ-7。菌株 WMQ-7 的形态特征、生理生化特征与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的特征基本一致; 16S rDNA 序列(GenBank 登录号为 EU807744)在系统发育树中与恶臭假单胞菌同属一个类群, 序列同源性 99%。鉴定菌株 WMQ-7 为恶臭假单胞菌, 其 ACC 脱氨酶活力为 0.671 U/μg。【结论】采用气体循环培养体系分离氢氧化细菌, 克服了传统配气法的局限。ACC 脱氨酶阳性菌株的筛选, 为深入研究氢氧化细菌作为植物根际促生菌的菌株特性和促生机制提供理论依据。

关键词: 紫花苜蓿; 氢氧化细菌; ACC 脱氨酶; 16S rDNA; 系统发育树; 恶臭假单胞菌

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0395-05

豆科作物的轮作、间作效益多被认为是来自豆科作物根部的残留氮的作用, 而新近的研究表明氮肥并不能完全取代豆科作物的轮作效果, 大约 75% 的增产效应还不能用已有的理论来解释^[1]。董忠民等^[2-5]通过对豆科植物根瘤固氮过程中放氢作用的研究和根际微生物的分析, 提出了不含吸氢酶(Without Uptake Hydrogenase, HUP⁻)的根瘤菌在固氮过程中释放的 H₂ 能够促进根际氢氧化细菌的生长并进一步促进植物生长的理论, 即“氢肥理论”^[3]。氢氧化细菌属于植物根际促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR), 对农作物的增产具有

重要作用, 其研究价值已引起国际研究者的重视^[6]。植物中 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)是乙烯合成的前体物质, 许多 PGPR 可诱导产生 ACC 脱氨酶, 分解 ACC 为丁酮酸和氨^[7], ACC 水平的降低导致了植物中乙烯含量的减少, 从而促进幼苗的生长^[8]。

但是, 豆科植物根际土壤中氢氧化细菌不易分离, 种群特征和系统发育研究尚不完善, 相关报道较少^[8]。本研究采用气体循环培养体系^[9]从结瘤紫花苜蓿(*Medicago sativa*)根际土壤分离出氢氧化细菌。本文报道了该菌株的分离、鉴定和 ACC 脱氨酶的酶

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30630054); 陕西省自然科学基金项目(SJ08-ZT03)

* 通信作者。Tel: +86-29-88303572; Fax: +86-29-88303534; E-mail: wwwang@nwu.edu.cn

作者简介: 付博(1982-), 女, 吉林人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物学的研究。E-mail: lisa_265@163.com

收稿日期: 2008-07-18; 修回日期: 2008-12-07

活力,为进一步探讨氢氧化细菌的分类地位、种群特征及植物促生机制提供重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样 按常规方法采集于陕西乾县新阳乡生长旺盛的 HUP⁻ 结瘤紫花苜蓿^[10] 根际土壤。

1.1.2 主要试剂和仪器 ACC 购自上海瀚鸿化工科技有限公司; 茚三酮购自上海科丰化学试剂有限公司; ZHWY-2112B 型双层全温度恒温摇床购自上海智城分析仪器制造有限公司; Himac CR 22G 型高速冷冻离心机购自日本 HITACHI 公司; 721 分光光度计购自上海第三分析仪器厂; JEM-2000EX 型电子显微镜购自日本 JEOL 公司。

1.1.3 培养基 MSA 培养基参照文献[9]配制。MSA 改良培养基 ACC 含量为 0.5 g/L。

1.2 菌株分离及筛选

1.2.1 氢氧化细菌的富集、分离、纯化 气体循环培养体系^[9]通过电解水的方式产生 H₂, 形成流速为 280 mL/min, 含 H₂ 量为 $4.16 \times 10^{-4} \sim 2.42 \times 10^{-3}$ mol/L 的混合气体, 富集土壤中的氢氧化细菌。富集培养 1 个月后将土壤稀释液涂布于 MSA 培养基, 通入与富集土壤时相同的混合气体分离纯化氢氧化细菌。

1.2.2 氧化氢能力的测定 向已纯化的氢氧化细菌斜面试管通入 H₂ 浓度为 2.42×10^{-3} mol/L 的混合气体, 气相色谱仪^[9]检测密闭条件下培养 3d 后的吸氢值, 即 H₂ 浓度减少量, 以此判断该菌株是否具有氧化氢能力以及氧化氢能力的大小。

1.2.3 ACC 脱氨酶阳性菌株筛选 取一环氢氧化细菌接种到 MSA 改良培养基中, 并同时接种到不含 ACC 的 MSA 改良培养基中作为对照组。以无菌 ACC 液体培养基和无菌不含 ACC 的液体培养基为空白对照, 120 r/min, 30 °C 培养 7 d。14430 × g 4 °C 离心 30 s, 取上清液在硅胶板上点样。展开剂: 正丁醇-乙酸-蒸馏水 (V/V/V) = 75:5:10; 显色剂 0.5% 的茚三酮溶液; 展层时间 2.5 h; 显色温度: 100 °C; 显色时间 20 min。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 菌体形态观察及生理生化实验 选取 ACC 脱氨酶阳性菌株 WMQ-7, 参照文献[11-12]方法观察菌体形态并测定生理生化特征。

1.3.2 16S rDNA 序列测定 菌株 WMQ-7 的 16S

rDNA 扩增及序列测定由大连 TaKaRa 公司完成。

1.3.3 系统发育树的构建 将菌株 WMQ-7 的 16S rDNA 序列通过 NCBI 网站录入, 与已知的序列对比并分析同源性。利用 DNASTAR (MegAlign) 将序列进行对位排列, 并手工适当校正。MEGA3.1 分子进化遗传分析软件分析碱基组成、GC 含量, 并以 Kimura-2 参数计算遗传距离, 采用 Nj 邻近法构建系统进化树。

1.4 ACC 脱氨酶的酶活力测定

1.4.1 标准曲线的绘制 参照文献[13]的方法绘制标准曲线。

1.4.2 酶活力测定 将菌株 WMQ-7 接到含 0.5 g/L ACC 的 MSA 改良培养基, 120 r/min, 30 °C 培养 24 h。培养液 14430 × g 4 °C 离心 30 s, 取上清液, 煮沸 5 min 灭活酶。茚三酮比色法^[13] (同 1.4.1) 测定 ACC 脱氨酶活力。本实验 ACC 脱氨酶的单位酶活定义为 30 °C, pH7.2 时, 每分钟消耗 1 μg ACC 的活力。

2 结果

2.1 氢氧化细菌的富集、分离和纯化

按上述方法, 在 MSA 固体培养基上培养 7 d 后获得单菌落, 对单菌落进一步纯化, 从富集的土壤中共分离纯化出 37 株细菌。

2.2 具有氧化 H₂ 能力菌株的筛选

检测菌株的氧化 H₂ 能力 (表 1), 有 8 株菌的吸氢值大于 2.44×10^{-4} mol/L, 占测定菌株总数的 25.93%, 初步确定为氢氧化细菌, 其中菌株 WMQ-7 和 FMG-5 的吸氢值大于 12.28×10^{-4} mol/L, 有较强的氧化氢能力^[9], 而菌株 WMQ-7 的氧化氢能力最强, 达 19.90×10^{-4} mol/L。

表 1 菌株氧化 H₂ 能力测定结果

Table 1 Results of oxidizing H₂

Strains No.	α (Initial H ₂) (10 ⁻⁴ mol/L)	β (Surplus H ₂) (10 ⁻⁴ mol/L)	γ (Net consumed H ₂) (10 ⁻⁴ mol/L)	Value of oxidizing H ₂
WMQ-7	19.90	1.31	18.59	IV
FMG-3	12.64	3.90	8.74	II
FMG-5	24.24	10.81	13.43	III
WMQ-8	19.50	10.57	8.93	II
LD-WMQ	13.35	7.40	5.96	I
WMG-8	18.02	11.27	6.75	II
FMQ-3	16.15	13.48	2.68	I
WMG-7	15.73	14.14	1.59	0
Blank	22.41	22.08	0.33	0

0: < 2.44×10^{-4} mol/L; I: 2.44×10^{-4} mol/L ~ 5.96×10^{-4} mol/L; II: 5.06×10^{-4} mol/L ~ 8.93×10^{-4} mol/L; III: 12.28×10^{-4} mol/L ~ 13.83×10^{-4} mol/L; IV: $\geq 18.59 \times 10^{-4}$ mol/L.

2.3 ACC 脱氨酶阳性菌株筛选

由 8 株氢氧化细菌薄层层析结果(图 1)可见,菌株 WMQ-7 的上清液没有检测到 ACC 这种非蛋白氨基酸的存在,而其它菌株培养后的上清液均有

ACC 显色反应,表明只有菌株 WMQ-7 能产生 ACC 脱氨酶并能分解利用 ACC,其它菌株不能产生 ACC 脱氨酶,故筛选出菌株 WMQ-7 进行鉴定。

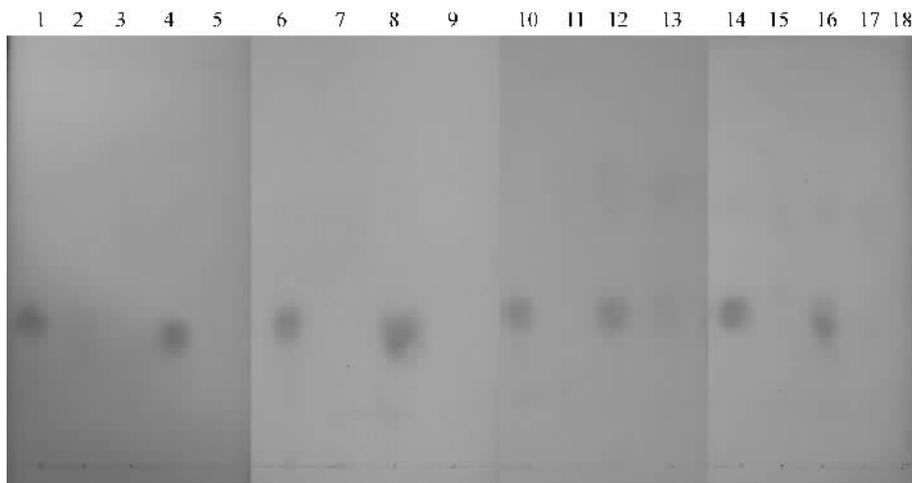


图 1 8 株氢氧化细菌的薄层层析结果

Fig. 1 The thin layer chromatography results of 8 strains after growing 7d. 1. Standard sample; 2. WMQ-7; 3. WMQ-7 without ACC; 4. FMG-3; 5. FMG-3 without ACC; 6. FMG-5; 7. FMG-5 without ACC; 8. WMQ-8; 9. WMQ-8 without ACC; 10. LD-WMQ; 11. LD-WMQ without ACC; 12. WMG-8; 13. WMG-8 without ACC; 14. FMQ-3; 15. FMQ-3 without ACC; 16. WMG-7; 17. WMG-7 without ACC; 18. Blank.

2.4 菌株 WMQ-7 的鉴定

2.4.1 形态和生理生化特征: 菌株 WMQ-7 为短杆状(图 2),大小约 $0.525 \mu\text{m} \sim 0.76 \mu\text{m} \times 0.84 \mu\text{m} \sim 1.80 \mu\text{m}$,一端丛生鞭毛,革兰氏染色阴性。在 MSA 半固体培养基上 30°C 培养 7 d 可形成 1.5 mm 菌落,呈圆形、边缘不整齐,白色,表面光滑。生理生化特征见表 2。

表 2 菌株 WMQ-7 生理生化特征

Table 2 Physiological characteristics of strain WMQ-7

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Oxidase	+	Gelatin liquefaction	-
Catalase	+	Nitrate reduction	+
Oxidative fermentation of glucose	-	Tryptophan deaminase test	+
V.P test	-	Indole production	-
M.R test	-	Urease test	-
Hydrolysis of starch	+	H ₂ S generation testing	-
Cellulose decomposing	-	L-Phenylalaninase	-
Use of citrate	+	Arginine dihydrolase	+

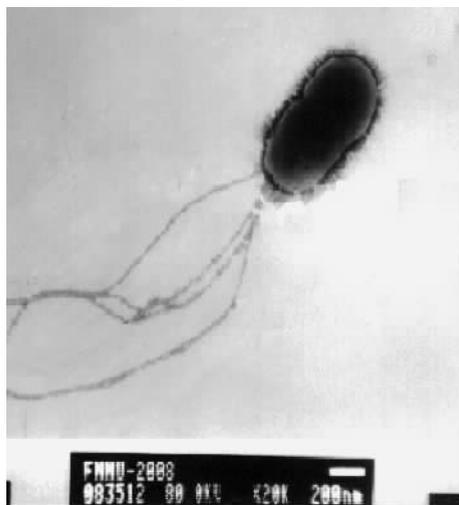


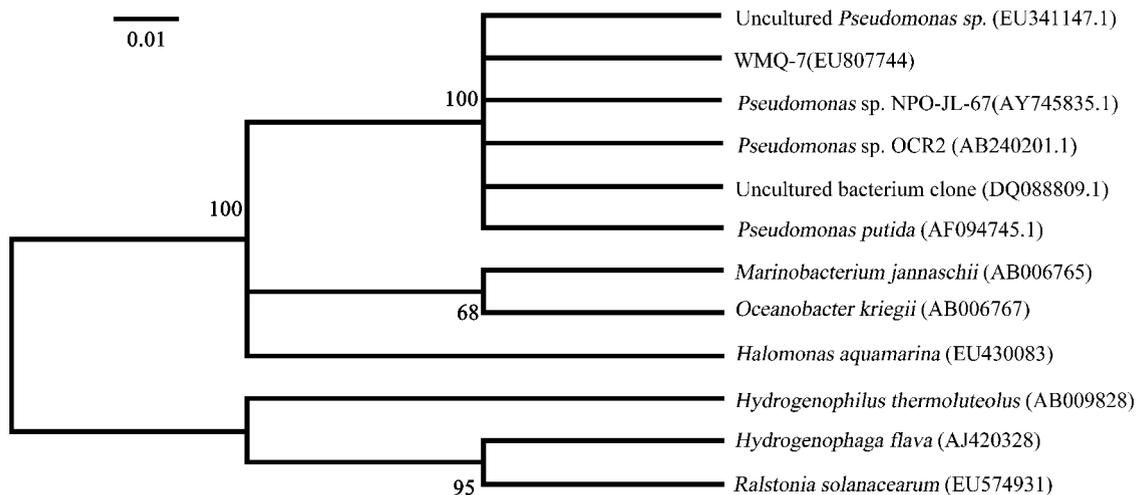
图 2 菌株 WMQ-7 透射电镜下的形态(20000 ×)

Fig. 2 Morphological character of strain WMQ-7 under transmission electron microscope (20000 ×).

2.4.2 16S rDNA 序列分析: 16S rDNA 片段长度为 1451 bp, GC 含量 53.8%, GenBank 登录号为 EU807744。以菌株 WMQ-7 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树(Nj 树)(图 3),树状图谱分为 3 个系统发育分支。WMQ-7 菌株与假单胞菌属在系统发育树上位于相同的发育分支,且与恶臭假单胞菌的同源性在 99%,同时结合菌体形态和生理生化特征,鉴定菌株 WMQ-7 为恶臭假单胞菌^[14-15] (*Pseudomonas putida*)。

2.5 菌株 WMQ-7 的 ACC 脱氨酶活力

按上述酶活力检测方法,测得样品 570 nm 处的吸光值为 0.4,根据标准曲线的回归方程 $y = 0.0011x + 0.0271$, $R^2 = 0.9958$,该菌株的 ACC 脱氨酶消耗 ACC 的浓度为 $161 \mu\text{g}/\text{mL}$,计算其酶活力为 $0.671 \text{ U}/\mu\text{g}_o$



3 以菌株 WMQ-7 16S rDNA 序列为基础的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 1451bp-fragment of 16S rDNA sequences of strain WMQ-7. Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 resampled data sets. After each bacterial name, the GenBank accession numbers are showed in parentheses. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide.

3 讨论

氢氧化细菌作为植物根际土壤中一个特殊的生理类群,其促进作物生长的研究才刚刚起步。PGPR的促生作用机制可能是由于细菌产生的 ACC 脱氨酶能够调节乙烯的合成,从而对植物生长造成影响^[16]。Jacobson 等^[17]已证明恶臭假单胞菌含有 ACC 脱氨酶,能够水解乙烯的生物合成前体 ACC,阻止乙烯的产生,促进根的伸长。特别是在播种后的几天内,这类细菌促进根的伸长作用能增强幼苗的成活率。Hontzeas 等^[18]同样证实了恶臭假单胞菌含有 ACC 脱氨酶而促进植物生长,并进一步讨论了相关酶学性质。沈萍^[19]等对细菌菌株 XG32 的产酶条件和酶活影响因素进行了研究,用 Bradford 比色法所测定的酶活力最大维持在 0.442 U/mg 左右。

本研究采用气体循环培养体系,以一个全新的角度从紫花苜蓿根际分离出氢氧化细菌,并筛选出 ACC 脱氨酶阳性菌株 WMQ-7。鉴定结果显示该菌株为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),与前人报道的 ACC 脱氨酶阳性菌株相比,菌株 WMQ-7 属于氢氧化细菌类群,具有较大耗氢作用,其 ACC 脱氨酶活力达 0.671 U/ μ g,酶活力提高了近 1000 倍,具有更强的植物促生作用。菌株 WMQ-7 是一株具有较高研究价值的菌株,不仅能够丰富现有理论对氢氧化细菌分类地位的划分,更为氢氧化细菌作为 PGPR 的促生机制研究提供实验依据。

“氢肥理论”的提出使越来越多的研究人员日益关注 HUP⁻豆科植物根际土壤中的氢氧化细菌,筛选具有植物促生作用的氢氧化细菌并深入探讨其作

为 PGPR 的种群结构和促生机制的研究仍是今后工作的重点。

参考文献

- [1] Hesterman OB, Sheaffer EC, Beurns DK, et al. Alfalfa dry matter and nitrogen production and fertilizer nitrogen response in leguminous-corn rotation. *Agronomy*, 1986, 78: 19-23.
- [2] Dong Z, Layzell DB. H₂ oxidation, O₂ uptake and CO₂ fixation in hydrogen treated soils. *Plant and Soil*, 2001, 229: 1-12.
- [3] Dong Z, Wu L, Kettlewell B, et al. Hydrogen fertilization of soils - is this a benefit of legumes in rotation. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26: 1875-1879.
- [4] Dong Z, Layzell DB. Why do legume nodules evolve hydrogen gas? *Nitrogen Fixation: Global Perspectives*, New York: CABI Publishing, 2002, 331-335.
- [5] Mclearn N, Dong Z. Microbial Nature of the hydrogen-oxidizing agent in hydrogen-treated soil. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 35: 465-469.
- [6] 胡江春, 薛德林, 马成新, 等. 植物根际促生菌 (PGPR) 的研究与应用前景. *应用生态学 (Chinese Journal of Applied Ecology)*, 2004, 15(10): 1963-1966.
- [7] 卫军, 潘其林, 张永清, 等. 具有 ACC 脱氨酶活性的细菌的分离和鉴定. *生物多样性 (Chinese Biodiversity)*, 1994, 2(1): 29-32.
- [8] 陈兴都, 王卫卫, 付博, 等. 大豆根际土壤中氢氧化细菌促生效应研究. *西北植物学报 (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 2008, 28(1): 136-140.
- [9] 陈兴都, 王卫卫, 郭利伟, 等. 大豆根际土壤中氢氧化细菌的分离、筛选和基本特征. *应用生态学报 (Chinese Journal of Applied Ecology)*, 2007, 18(9): 2069-2074.

- [10] Scott D Cunningham, Yoram Kapulnik, Donald A Phillips. Distribution of hydrogen-metabolizing bacteria in alfalfa field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(5):1091-1095.
- [11] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 王昂, 王丽丽, 仪宏, 等. 茚三酮比色法测定谷氨酸含量的研究. 中国调味品(*China Condiment*), 2005, (8):50-53.
- [14] 孙丹, 余养盛, 杨文博, 等. L-半胱氨酸产生菌恶臭假单胞菌 TS1138 的鉴定和诱变育种. 天津大学学报(*Journal of Tianjin University*), 2007, 40(4):421-426.
- [15] 于素芳, 丁延芹, 姚良同, 等. 一株棉花根际铁载体产生菌 E19 的分离鉴定. 生物技术(*Biotechnology*), 2007, 17(6):19-21.
- [16] 刘维红, 闫淑珍, 杨启银, 等. ACC 脱氨酶活性菌株筛选及其对番茄初生苗生长的影响. 江苏农业科学(*Jiangsu Agricultural Sciences*), 2006, (2):80-84.
- [17] Jacobson CB, Pastemak JJ, Glick B R. Partial purification and characterization of the enzyme ACC deaminase from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Chemistry*, 1994, 40(2):1019-1025.
- [18] Hontzas N, Zoidakis J, Glick BR, et al. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, (1703):11-19.
- [19] 沈萍, 刘维红, 闫淑珍, 等. XG32 菌株产 ACC 脱氨酶的培养条件和酶活影响因素. 南京师大学报(*Journal Of Nanjing Normal University*), 2008, 31(1):104-108.

Isolation and identification of hydrogen-oxidizing bacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and the determination of enzymatic activity

Bo Fu¹, Weiwei Wang^{1*}, Ming Tang², Xingdu Chen³

(¹Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Northwest University, Xi'an 710069, China)

(²College of Forest, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

(³School of Environment and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract [Objective] We used *Medicago sativa* rhizosphere in Shaanxi province of China to isolate and identify hydrogen-oxidizing bacteria that produced ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase, and then studied the mechanism why they can promote the growth of plants. **[Methods]** Hydrogen-oxidizing bacteria were isolated by gas-cycle incubation system. We studied the morphological character, physiological characteristics, 16S rDNA sequence analysis and built the phylogenetic tree. Thin layer chromatography was used to isolate the strain that produced ACC deaminase. Ninhydrin reaction was used to test the enzyme activity. **[Results]** In total 37 strains were isolated, 8 of which could oxidize H₂ strongly and grow chemolithoautotrophically. We initially identified them as hydrogen-oxidizing bacteria. Only strain WMQ-7 produced ACC deaminase among these 8 strains. Morphological and physiological characteristics analysis showed that strain WMQ-7 was essentially consistent with *Pseudomonas putida*. The 16S rDNA sequence analysis (GenBank accession number EU807744) suggested that strain WMQ-7 was clustered together with *Pseudomonas putida* in phylogenetic tree, with the sequence identity of 99%. Based on all these results, strain WMQ-7 was identified as *Pseudomonas putida*. The enzyme activity of strain WMQ-7 was 0.671 U/μg. **[Conclusion]** A strain producing ACC deaminase was identified and tested.

Keywords: *Medicago sativa*; hydrogen-oxidizing bacteria; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase; 16S rDNA; phylogenetic tree; *Pseudomonas putida*

(本文责编:王晋芳)