

ACC 脱氨酶活性菌株 ACC 30 的分离、 鉴定及其促生作用

黄盖¹ 高焱¹ 王琛¹ 赵倩¹ 张文峰¹ 党娟¹ 马晓棠¹ 颜霞^{1*} 高建平²

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院 陕西 杨凌 712100)

(2. 甘肃中医学院 甘肃 兰州 730000)

摘要: 【目的】筛选具有 1-氨基环丙烷-1-羧酸(简称 ACC)脱氨酶活性的菌株,并探索该类菌的促生作用,有助于研发微生物肥料,实现农业增产。【方法】以 ACC 为唯一氮源,从土壤中富集和分离 ACC 脱氨酶产生菌;测定 ACC 脱氨酶的比活力,对酶活性最强的菌株根据形态和培养特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列进行分类鉴定;分别采用菌液培养接种法与菌液浸种接种法初步研究该菌株对紫花苜蓿幼苗生长的促生作用。【结果】筛选得到 6 株 ACC 脱氨酶阳性细菌,其中菌株 ACC 30 酶活性最高,为 0.217 U/mg,根据培养特征观察和生理生化指标测定结果,结合 16S rDNA 序列比对分析,确定 ACC 30 为产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)。促生试验表明,ACC 30 可促进紫花苜蓿幼苗根伸长,菌液培养接种法与菌液浸种接种法两种处理方法下 ACC 30 分别使幼苗根相对伸长 135%、136%,促生作用均明显且基本一致。但是,两种方法处理下 ACC 30 均抑制幼苗下胚轴伸长。【结论】筛选获得 ACC 脱氨酶活性菌株 ACC 30,其酶活性较高且促生作用明显,有望进一步研发成为微生物肥料。

关键词: ACC 脱氨酶活性菌株,产气肠杆菌,促生作用,紫花苜蓿

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31101476);中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. QN2009066);西北农林科技大学大学生创新性实验计划项目(No. 2201110712212)

*通讯作者: Tel: 86-29-87092262; 邮箱: yanxia@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2012-06-25; 接受日期: 2012-08-31

ACC 30 strain with ACC deaminase activity: its isolation, identification and growth-promoting effect

HUANG Gai¹ GAO Han¹ WANG Chen¹ ZHAO Qian¹ ZHANG Wen-Feng¹
DANG Juan¹ MA Xiao-Tang¹ YAN Xia^{1*} GAO Jian-Ping²

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: [Objective] Screening strains with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and exploring the growth promoting effect were conducive to further develop microbial fertilizers and increase agricultural yield. [Methods] ACC deaminase positive bacteria were enriched and isolated with ACC as the sole nitrogen source. These strains' ACC deaminase activities were also evaluated. The strain with the highest enzyme activity was identified according to morphological, physiological-biochemical characteristics and 16S rDNA sequences analysis. The target strain's ability to promote the growth of alfalfa seedlings was preliminarily studied. [Results] Six ACC deaminase positive strains were obtained. Among them the strain ACC 30 was prominent with high ACC deaminase activity 0.217 U/mg. Based on the cultural morphological features as well as physiological-biochemical parameters in combination with 16S rDNA sequences analysis, the strain ACC 30 was identified as *Enterobacter aerogenes*. The growth-promoting trial indicated that both seeds incubating with bacterium suspension (SIBS) and seeds dipping with bacterium suspension (SDBS) elongated the roots of alfalfa seedlings by 135%, 136% respectively compared with the control group. The growth-promoting effects under two treatments were equally significant and consistent. Interestingly, they all showed that ACC 30 strain prohibited hypocotyl elongation. [Conclusion] The isolated strain ACC 30 with high ACC deaminase activity was expected to be developed into an excellent microbial fertilizer.

Keywords: Strain with ACC deaminase activity, *Enterobacter aerogenes*, Growth-promoting effect, Alfalfa

目前, 由于全世界对农药和化学肥料的依赖性日益增强, 造成了有机肥使用不足, 土壤养分比例失调, 土地板结, 土壤质量下降等一系列问题。微生物肥料具有肥效高、本身无毒、不污染环境且成本低等特点, 是比较理想的替代品, 因此, 合理开发和利用微生物肥料, 提高作物的产量是农业持续发展的重要途径^[1]。

ACC 脱氨酶是一种有效降低逆境乙烯含量的外源促生物质, 该酶在干旱、盐胁迫及重金属污染等逆境条件下能显著提高农作物的抗逆性和增加产量。有些微生物可以分泌 1-氨基环丙烷-1-羧酸(简称 ACC)脱氨酶从而显著促进植物生长^[2-3], 如番茄、黄瓜、辣椒等蔬菜瓜果类和小麦、豆科等粮食作物。国外学者对菌株分泌 ACC 脱氨酶

这一特性进行了大量的研究,但截至目前,我国在这一领域的研究工作开展的不多^[4],其中魏素娜等^[5]从旱地小麦根际土壤中分离得到 ACC 脱氨酶活性菌,但未进一步开展促生方面的研究;刘延吉等^[6]筛选出 ACC 脱氨酶活性菌并研究了其对草籽根系伸长的影响。但国内外关于 ACC 脱氨酶活性菌株对紫花苜蓿促生作用的研究尚未见报道。

紫花苜蓿被称为“牧草之王”,具有适应性强、蛋白质含量丰富等特点,是世界上优质豆科牧草之一。目前,由于我国饲料特别是优质蛋白饲料严重短缺,作为高蛋白饲料的紫花苜蓿,其种植面积和市场需求都在迅速扩大^[7],因此,研究高 ACC 脱氨酶活性菌株对紫花苜蓿的促生作用,研发微生物肥料,对提高紫花苜蓿的产量具有重大的价值。

本文以 ACC 为唯一氮源筛选 ACC 脱氨酶活性菌株,对其中酶活性最高的菌株根据形态培养结果、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析进行分类鉴定,并以紫花苜蓿种子为材料进行促生作用研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 土壤及菌株来源:土壤样本采自西北农林科技大学园艺学院试验地,主要取自草莓、小麦等农作物根际土壤,个别样品取自荒地,土壤样品共计 20 份;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由西北农林科技大学微生物研究中心提供。

1.1.2 植物材料:紫花苜蓿(*Medicago sativa* var. Iroquois)种子。

1.1.3 主要仪器和试剂:ACC (A-3903)、 α -丁酮酸试剂购自美国 Sigma 公司;菌体 DNA 提取试剂购自北京百泰克生物技术有限公司;PCR 试剂购自北京康为世纪生物技术有限公司;16S rDNA

扩增引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成;其它试剂均为国产分析纯。

PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);紫外分光光度仪 UV-1800(上海美谱达仪器有限公司);分析天平 AL204 [梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.1.4 培养基:富集培养基:PAF (*Pseudomonas* agar F)培养基(g/L):蛋白胨 10,酪蛋白水解物 10,无水 $MgSO_4$ 1.5, K_2HPO_4 1.5,甘油 10 mL, pH 7.2。

筛选培养基:DF 盐培养基(g/L):组分 1: H_3BO_3 10 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 11.2 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 124.6 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 78.2 mg, MnO_3 10 mg, 以上溶解于 100 mL 无菌水中, $-4^\circ C$ 保存;组分 2: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 mg, 溶于 10 mL 无菌水中, $-4^\circ C$ 保存;组分 1 与组分 2 溶液各取 0.1 mL, 再加入 KH_2PO_4 4, Na_2HPO_4 6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 葡萄糖 2, 葡萄糖酸 2, 柠檬酸 2, $(NH_4)_2SO_4$ 2, H_2O 1 000 mL, pH 7.2。

加富培养基 ADF:把 ACC 溶于超纯水,抽滤灭菌,加入到不含有 $(NH_4)_2SO_4$ 且预先灭菌的 DF 盐培养基中, pH 7.2。ACC 添加的终浓度为 3.0 mmol/L。

分离纯化培养基:于 ADF 加富培养基培养液中加入琼脂 15–20 g/L, pH 7.2。

TSB 培养基(g/L):胰蛋白胨 17,大豆胨 3, NaCl 5, 葡萄糖 2.5, K_2HPO_4 2.5, pH 7.1。

1.2 方法

1.2.1 ACC 脱氨酶活性菌的富集、筛选和分离:称取来源不同的土壤样品各 5 g 分别加入到 50 mL 无菌水中振荡制成土壤悬浮液,吸取 1 mL 悬浮液加入到 50 mL PAF 培养液中, $28^\circ C$ 、200 r/min 条件下振荡培养。24 h 后,从其中吸取 1 mL 菌悬液重复转接 1 次。从第 2 次菌悬液中转移 1 mL 至 50 mL DF 培养液中,相同条件下培养 24 h 后从中吸取 1 mL 菌悬液加入到 50 mL ADF

培养液中, 相同条件下培养 24 h, 用于 ACC 脱氨酶活性细菌的筛选。梯度稀释 ADF 培养液中的菌悬液, 并涂布于 ADF 固体平板, 28 °C 恒温箱中培养, 待长出单菌落后挑取单菌落纯化后保存于 TSB 斜面培养基。

$$\text{酶比活力(U/mg)} = \frac{\text{生成}\alpha\text{-丁酮酸物质的量}(\mu\text{mol})}{\frac{\text{总蛋白质含量(mg)}}{\text{测总蛋白质时所取的体积}(\mu\text{L})} \times \text{测酶活时所用的体积}(\mu\text{L}) \times \text{酶活反应时间}(\text{min})}$$

1.2.3 菌株的促生作用试验: 平皿促生试验参照沈萍等^[10]的方法, 挑取饱满无病害的紫花苜蓿种子进行表面消毒, 消毒后立即用无菌水充分洗涤, 并将 ACC 30、枯草芽孢杆菌分别配制成相应的菌悬液, 菌悬液的浓度为 10⁸ CFU/mL。

促生试验分菌液培养接种法与菌液浸种接种法两种方法进行处理: (1) 菌液培养接种法: 将消毒洗净后的种子置于培养皿中, 培养皿底部分别放有用 7 mL ACC 30 菌悬液、枯草芽孢杆菌菌悬液、无菌水湿润的滤纸; (2) 菌液浸种接种法: 将处理后的种子分别浸于 ACC 30 菌悬液、枯草芽孢杆菌菌悬液、无菌水中, 浸种过夜后, 置于底部放有滤纸(用无菌水湿润)的培养皿中。

两种方法的培养皿上部均封膜, 置于 28 °C 恒温培养箱中暗培养, 7 d 后测定根长及下胚轴长。每皿 50 粒种子, 每个处理 3 次重复。

1.2.4 菌株的鉴定: (1) 生理生化鉴定: 参照伯杰氏细菌鉴定手册(第 9 版)^[11]。

(2) 16S rDNA 序列扩增和序列分析: 采用碱裂解法提取菌株 ACC 30 的总 DNA。根据原核生物 16S rDNA 保守序列通用引物^[12] PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 PB (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 36 个循环; 72 °C 10 min。扩增体系为 50 μL。取 5 μL PCR 产物经

1.2.2 ACC 脱氨酶活力测定: 参考 Seleh 等^[8]的方法, 将每分钟形成 1 μmol α-丁酮酸的量定义为 1 个酶活力单位。总蛋白质含量的测定采用 Bradford 法^[9], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。ACC 脱氨酶比活力计算公式:

1%琼脂糖凝胶电泳分离检测, 具有 1 500 bp 左右单一条带的剩余 PCR 产物送至上海生物工程技术服务有限公司进行测序。将测定所得序列与 NCBI 数据库 BLAST 同源性比对分析, 选取同源性较高的模式菌株与菌株 ACC 30 序列用 ClustalX 1.81 软件进行多序列比对分析, 用软件 Treecon (Version 1.3b) 中的邻接法 (Neighbor-Joining method) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 ACC 脱氨酶活性菌的筛选结果及 ACC 脱氨酶活性检测

经过富集定向筛选, 从土壤中分离纯化得到 6 株能在以 ACC 为唯一氮源的 ADF 培养基上生长的菌株(表 1), 将这 6 株菌株分别编号为 ACC 9-1、ACC 30、ACC 16、ACC 22、ACC 4、ACC 6。酶活测定发现各菌株酶比活力差异较大, 其中 ACC 30 的 ACC 脱氨酶活性最高, 为 0.217 U/mg。此外, 实验室保存的菌株枯草芽孢杆菌经测定 ACC 脱氨酶比活力为 0。

2.2 菌株的促生作用

2.2.1 菌株对紫花苜蓿幼苗生长的影响: 菌株对紫花苜蓿幼苗的促生作用见图 1、2, 菌液培养接种法与菌液浸种接种法两种处理下, 菌株 ACC 30 对紫花苜蓿的促生作用均明显, 该菌株处理紫花苜蓿种子后根伸长的长度明显大于对照组 CK 和 *Bacillus subtilis* 处理组。

表 1 6 株 ACC 脱氨酶阳性菌株的来源及酶活力
Table 1 Source and enzyme activity of 6 positive strains with ACC deaminase

菌株 Strain	来源 Source	ACC 脱氨酶活力 ACC deaminase activity (U/mg)
ACC 9-1	小麦根际土壤	0.015
ACC 30	草莓根际土壤	0.217
ACC 16	草莓根际土壤	0.021
ACC 22	小麦根际土壤	0.017
ACC 4	草莓根际土壤	0.038
ACC 6	荒地	0.005

注: 以上根际土壤均采自西北农林科技大学园艺学院试验地.

Note: Rhizosphere soils were collected from the experimental field of College of Horticulture, Northwest A&F University.



图 1 菌液培养接种法

Fig. 1 Seeds incubating with bacterium suspension (SIBS)

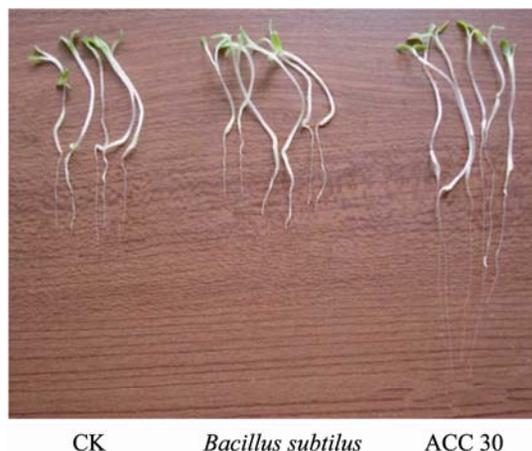


图 2 菌液浸种接种法

Fig. 2 Seeds dipping with bacterium suspension (SDBS)

每个处理随机地挑选 40 棵紫花苜蓿幼苗测定根与下胚轴的长度, 并利用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析和 Z 检验, 统计结果见表 2、3。

结果表明, 对于 ACC 30, 菌液培养接种法和菌液浸种接种法分别处理种子时, 与 CK 相比幼苗根相对伸长率分别为 135%、136%, 下胚轴相对伸长率分别为 93%、85%, 统计分析具有显著性差异; 对于枯草芽孢杆菌, 菌液培养接种法和菌液浸种接种法分别处理种子时, 与 CK 相比, 幼苗下胚轴相对伸长率分别为 88%、73%, 统计分析具有显著性差异, 但对幼苗根伸长无影响, 无统计上的显著差异。

总结得出, 菌株 ACC 30 能够促进紫花苜蓿幼苗根的伸长, 枯草芽孢杆菌对紫花苜蓿幼苗根伸长无影响, 两种菌株对紫花苜蓿幼苗下胚轴的伸长均有一定的抑制作用。

2.2.2 不同处理方法对紫花苜蓿幼苗生长影响: 从表 2、3 可以看出, 平皿促生试验中, 菌液培养接种法与浸种子接种法两种处理方法在 ACC 30 促进根生长方面表现一致, 无差异性, 这表明不同的接种方式并不影响该菌对植物根的促生作用。

表 2 菌液培养接种法对紫花苜蓿幼苗影响
Table 2 The effect of seeds incubating with bacterium suspension (SIBS) on alfalfa seedlings

处理 Treatment	根长 Root length		下胚轴长 Hypocotyl length	
	平均值	根相对伸长率	平均值	下胚轴相对伸长率
	Average (mm)	Relative length rate (%)	Average (mm)	Relative length rate (%)
CK	27.69±5.23	100	29.50±6.70	100
<i>Bacillus subtilis</i>	25.81±9.11	93	25.99±5.27**	88
ACC 30	37.39±13.83**	135	27.51±7.02*	93

注: *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

Note: *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

表 3 菌液浸种接种法对紫花苜蓿幼苗的影响
Table 3 The effect of seeds dipping with bacterium suspension (SDBS) on alfalfa seedlings

处理 Treatment	根长 Root length		下胚轴长 Hypocotyl length	
	平均值	根相对伸长率	平均值	下胚轴相对伸长率
	Average (mm)	Relative length rate (%)	Average (mm)	Relative length rate (%)
CK	27.96±9.75	100	29.48±7.78	100
<i>Bacillus subtilis</i>	25.59±8.13	92	21.65±6.10**	73
ACC 30	38.06±12.56**	136	25.17±7.19**	85

注: **: $P \leq 0.01$.

Note: **: $P \leq 0.01$.

2.3 菌株鉴定

2.3.1 形态和生理生化特征测定: 菌株 ACC 30 在 LB 平板上菌落形态为圆形凸起, 乳黄色, 有光泽, 表面光滑湿润, 边缘整齐; 菌体杆状, 革兰氏染色为阴性(图 3); 菌体大小为(0.6–0.9) $\mu\text{m} \times$ (1.5–3.6) μm 。



图 3 菌株 ACC 30 的革兰氏染色(1 000 \times , 光学显微镜)
Fig. 3 Gram stain of strain ACC 30 (1 000 \times , optical microscope)

菌株 ACC 30 的生理生化特征测定结果见表 4。菌株 ACC 30 具有运动性, 能够利用柠檬酸盐、D-葡萄糖、肌糖、L-天冬酰胺、L-半胱氨酸等, 能够分泌酯酶, 还原硝酸盐, 但是不能分解纤维素和硫化物, 不能分泌淀粉酶, 不能使明胶液化。

2.3.2 菌株 16S rDNA 序列扩增和序列分析: 从 ACC 30 菌株基因组内扩增出 1 500 bp 左右的单一条带(图 4), 经测序确定为 16S rDNA 基因序列。

将测定所得序列提交到 GenBank, 获得登录号为 JX074045 (表 5), 序列与 NCBI 数据库中的 16S rDNA 序列进行 BLAST 比对分析。比对结果表明, NCBI 数据库中与菌株 ACC 30 相似度较高的菌株均属于肠杆菌属 *Enterobacter* sp., 其中模式种 *Enterobacter aerogenes* NCTC 10006^T (GenBank accession number: AB004750) 与菌株 ACC 30 的相似性达到了 99.2% (表 5)。

表 4 ACC 30 菌株生理生化特征
Table 4 Physiological-biochemical characteristics of strain ACC 30

测试项 Test item	试验结果 Results	测试项 Test item	试验结果 Results
淀粉水解 Starch hydrolyzation	-	D-葡萄糖 D-glucose	+
柠檬酸盐利用 Citrate test	+	肌糖 Inositol	+
运动性 Mobility	+	D-乳糖 D-lactose	+
V-P 试验 The diacetyl test	+	D-蔗糖 D-sucrose	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	L-天冬酰胺 L-asn	+
H ₂ S 反应 H ₂ S reaction	-	L-半胱氨酸 L-cys	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	L-酪氨酸 L-tyr	+
吐温-20 反应 Tween-20 reaction	+	L-丝氨酸 L-ser	+
吐温-80 反应 Tween-80 reaction	+	纤维素水解 Cellulose hydrolyzation	-

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

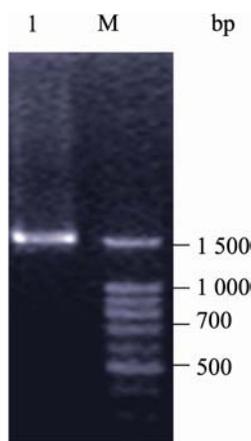


图 4 菌株 ACC 30 的 16S rDNA 基因 PCR 扩增电泳图
Fig. 4 PCR products' electrophoresis map of 16S rDNA of ACC 30 strain

注: M: Marker; 1: ACC 30.

Note: M: Marker; 1: ACC 30.

选取肠杆菌属中的模式菌株与菌株 ACC 30 进行多序列比对分析, 并构建得到系统发育树

(图 5)。结果显示, 菌株 ACC 30 与模式种 *Enterobacter aerogenes* NCTC 10006^T 聚于同一个分支中, 在分类地位上均属于肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)。

3 讨论

从土壤中分离得到 6 株 ACC 脱氨酶阳性菌, 其中菌株 ACC 30 的 ACC 脱氨酶比活力 (0.217 U/mg) 比魏素娜等^[5]报道的霍氏肠杆菌 AS (ACC 脱氨酶比活力为 0.018 6 U/mg) 和变形斑沙雷氏菌 CS (ACC 脱氨酶比活力为 0.016 7 U/mg) 的酶比活力高出一个数量级, 因此, 菌株 ACC 30 表现出很高的 ACC 脱氨酶活性。

16S rDNA 序列分析的系统发育学和表型特征存在较好的相关性^[13], 通过 16S rDNA 序列同源性分析与生理生化试验相结合是一种比较快

表 5 ACC 脱氨酶活性菌株 ACC 30 的 16S rDNA 鉴定结果
Table 5 Identification of ACC 30 with ACC deaminase activity based on 16S rDNA gene sequences

菌株 Strain	登录号 Accession number	碱基数 Base numbers (bp)	二者的相似度 Similarity (%)
ACC 30	JX074045	1 453	99.2
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC 10006 ^T	AB004750	1 438	

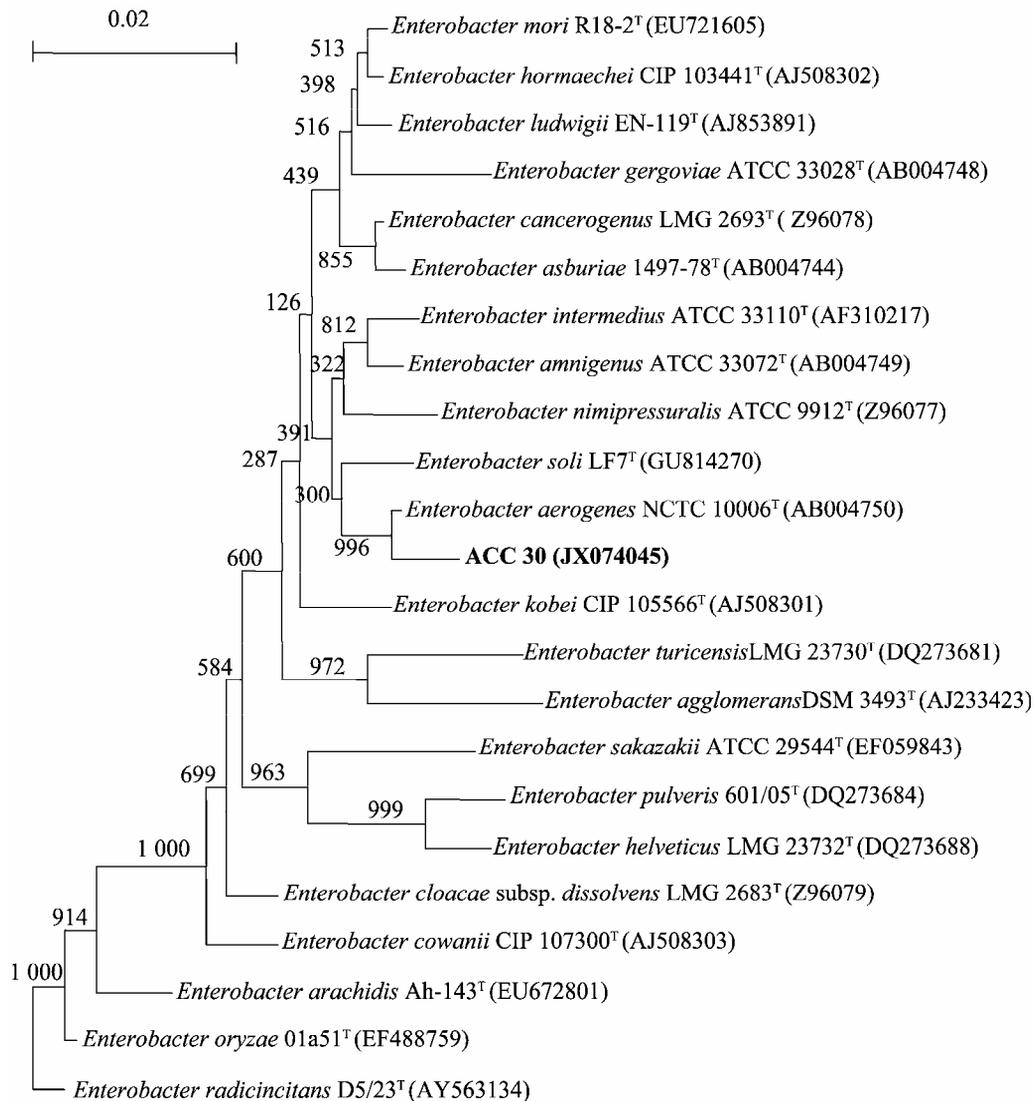


图 5 基于 16S rDNA 序列的 ACC 30 菌株的系统发育树

Fig. 5 The phylogenetic tree of the strain ACC 30 based on 16S rDNA sequences

注: 括号内为 GenBank 登录号; 进行 1 000 次的相似度重复计算; 图中发育树节点显示根据邻接法(Neighbor-Joining method)进行 1 000 次相似度重复计算时的 Bootstrap 值; 比例尺为 2% 的序列差异。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets. Bar: 2% sequence divergence.

速准确的方法^[14], 越来越广泛的应用于细菌分类。本文采用 16S rDNA 序列分析并结合形态培养特征和生理生化测定, 最后确定 ACC 30 为产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)。

截至目前, 报道肠杆菌属的某些种具有 ACC 脱氨酶活性, 比如霍氏肠杆菌、路德维希肠杆菌、

阿氏肠杆菌和阴沟肠杆菌等, 但是, 产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)能够分泌 ACC 脱氨酶的报道甚少。据研究报道, 产气肠杆菌具有丰富的生物学特性, 比如降解拟除虫菊酯类农药^[15]、解磷作用^[16]。本研究筛选出产气肠杆菌具有 ACC 脱氨酶活性, 拓宽了产气肠杆菌的应用生物学特性。

Li 等^[17]研究表明, ACC 脱氨酶活性细菌通过产生 ACC 脱氨酶调节乙烯水平, 促进植物根伸长。本文结果为 ACC 脱氨酶活性菌株 ACC 30 促进根伸长, 无该酶活性的枯草杆菌不能促进根伸长。这个结果间接地验证了菌株通过分泌 ACC 脱氨酶促进了植物根的伸长。同时, 本文也发现 ACC 30 对紫花苜蓿根和下胚轴部位的生长影响具有差异性, 不表现整体一致性, 即该菌不能同时促进紫花苜蓿根和下胚轴伸长, 具体表现为对根伸长的促进, 对下胚轴伸长的抑制, 这与沈萍等^[10]的研究有所差异, 他们报道在菌液培养接种时 ACC 脱氨酶活性菌对辣椒幼苗根和下胚轴的伸长均有促进作用。据此本文推断, ACC 脱氨酶活性菌株能够促进植物根的伸长, 但对下胚轴伸长的促进或抑制作用可能与菌株能否分泌 ACC 脱氨酶这一生物特性无直接关系, 而与试验菌株的其它生物特性有关, 具体原因尚待进一步研究。

平皿促生试验也表明不同的接种方式并不影响 ACC 30 对植物根的促生作用, 这验证了 Hong 等^[18]的研究, 他们假设 ACC 脱氨酶活性细菌只须附着于种皮便能促进根伸长。按照这个假设, 笔者认为由于菌液培养接种法与浸种子接种法均能够保证该菌附着于种皮, 所以, 不同的接种方式并不影响 ACC 30 的促生作用。因此, 农业应用中可以采取不同的接种菌剂方法。

综上所述, 菌株 ACC 30 对紫花苜蓿的促生作用明显, 下一步将展开该菌株作为微生物肥料的研究, 并进行大田促生试验研究。

参 考 文 献

- [1] 谢明杰, 程爱华, 曹文伟. 我国微生物肥料的研究进展及发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(4): 42-45.
- [2] Glick BR, Todorovic B, Czarny J. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase[J]. *Critical Reviews in Plant Science*, 2007, 26(5/6): 227-242.
- [3] Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant-growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994, 40(11): 911-915.
- [4] 姚军朋, 姚拓, 王小利. ACC 脱氨酶的应用研究进展与评述[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 88-91.
- [5] 魏素娜, 蒋帅, 黄锡云, 等. 旱地小麦根际细菌中产生1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶菌株的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 722-728.
- [6] 刘延吉, 王靖, 田晓艳, 等. 耐盐菌株的筛选及其促生作用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(3): 360-362.
- [7] 张春梅, 王成章, 胡喜峰, 等. 紫花苜蓿的营养价值及应用研究进展[J]. 中国饲料, 2005(1): 15-17.
- [8] Seleh SS, Glick BR. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(8): 698-705.
- [9] 郭嵩光, 郭泽坤. 生物化学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 55-57.
- [10] 沈萍, 闫淑珍, 陈双林, 等. 具 ACC 脱氨酶活性的植物内生细菌对辣椒的促生作用和对疫霉病的防治作用[J]. 植物保护学报, 2008, 35(1): 28-32.
- [11] Buchanann BE, Bergey NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 9th ed. London: Williams and Wilkins Company, 1994: 597-635.
- [12] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44(3): 253-262.

- [13] Vandamme P, Pot B, Gillis M. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic[J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2): 407-438.
- [14] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [15] 廖敏, 张海军, 谢晓梅. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌产气肠杆菌的分离、鉴定及降解特性研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(8): 2445-2451.
- [16] 伊璠, 高晓蓉, 安利佳. 产气肠杆菌 PSB28的解磷机理研究[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(27): 245-249.
- [17] Li JP, Ovakim DH, Charles TC, et al. An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation[J]. *Current Microbiology*, 2000, 41(2): 101-105.
- [18] Hong YW, Bernard RG, Pasternak JJ. Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study[J]. *Current Microbiology*, 1991, 23(2): 111-114.

~~~~~  
(上接 p.801)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>