

一株具有 ACC 脱氨酶活性固氮菌的 筛选与鉴定

陈倩, 胡海燕, 高森, 徐晶, 周义清, 孙建光*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业部作物营养与施肥重点实验室, 北京 100081)

摘要: ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, 1-氨基环丙烷-1-羧酸)脱氨酶是近年来发现的许多植物促生细菌(Plant growth promoting bacteria, PGPB)共有的一个特征性酶,很多具有 ACC 脱氨酶活性的细菌能够增强植物抗逆性,缓解干旱、淹水、盐碱、高温、病虫害等对植物的危害。因此,ACC 脱氨酶阳性细菌的筛选和研究对促进农业生产具有重要意义。本文从大量样品中分离、筛选到 1 株 ACC 脱氨酶阳性固氮菌,编号为 7037,该菌株 ACC 脱氨酶活性为 α -丁酮酸 $2.530 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, protein, 固氮酶活性为 C_2H_4 $10.068 \text{ nmol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, protein; 具有较为广泛的碳源利用能力和很强的环境适应能力,被鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)的一个种。盆栽试验显示,小白菜接种 7037 菌株比对照组鲜重增加了 139%,差异极显著。该菌株可望进一步研究开发成为微生物肥料的生产菌种。

关键词: 生物固氮; ACC 脱氨酶; 植物抗逆性; 植物促生细菌

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2011)06-1515-07

Screening and identification of a nitrogen fixing bacteria with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity

CHEN Qian, HU Hai-yan, GAO Miao, XU Jing, ZHOU Yi-qing, SUN Jian-guang*

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/
Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization of Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase is a common characteristic enzyme in plant growth promoting bacteria (PGPB) in recent years. Many ACC deaminase positive bacteria have the ability to increase plant resistance against environmental stresses like drought, flood, salinity and high temperature, therefore, screening and investigation on the ACC deaminase positive bacteria are important for agriculture. In this work, one strain designed as 7037 was screened. The results show that the ACC deaminase activity of the strain is $2.530 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, protein and the nitrogenase activity is C_2H_4 $10.068 \text{ nmol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, protein. The strain 7037 shows a relative extensive utilization for carbon sources and strong environmental adaptability, and is identified as *Arthrobacter* sp. The pot trial shows that the fresh weight of Chinese cabbage inoculated with the strain 7037 is increased by 139% compared with the no inoculation control. The strain 7037 is possible to be further developed as an excellent strain for microbial fertilizer production.

Key words: biological nitrogen fixation; ACC deaminase; plant stress resistance; plant growth promoting bacteria

近年来,干旱、洪涝、土壤次生盐碱化及重金属污染等逆境条件造成农作物减产等问题日益严重,如何有效提高植物抗逆能力和增加农作物产量已成

为当前农业可持续发展的重要内容。乙烯是高等植物的内源激素,植物生长发育通常只需要较低水平的乙烯,但在接近成熟或遇到干旱、淹水、高温、机械

收稿日期: 2011-03-30

接受日期: 2011-07-14

基金项目: 国家“863”项目(2009AA06Z316); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2011-33)资助。

作者简介: 陈倩(1986—),女,山西太原人,硕士研究生,主要从事微生物肥料方面的研究。E-mail: qchen88@126.com

* 通讯作者 Tel: 010-82108701, E-mail: jgsun@caas.ac.cn

损伤、病虫害侵袭时会大量产生乙烯,这是植物对环境的一种生理应激反应,但过量乙烯又会导致植物生长发育受阻甚至死亡。1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)是合成乙烯的前体物质,近年来发现,许多植物促生细菌(Plant growth promoting bacteria, PGPB)具有 ACC 脱氨酶活性,能够把 ACC 分解成氨和 α -丁酮酸减少乙烯合成,从而降低植物对逆境的敏感性,提高植物抗逆能力^[1],而且可以促进有机物污染和重金属污染土壤的植物修复^[2],因此人们采用检测 ACC 脱氨酶的方法来筛选植物促生细菌^[3]。本文从采自全国 13 个省市自治区的 70 份土壤样品分离到固氮菌 103 株,进一步筛选出 ACC 脱氨酶阳性菌 1 株。

1 材料与方法

1.1 菌株、样品与试剂

圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum* ACCC11103 来源于前苏联,是固氮微生物肥料生产常用菌种,现保藏于中国农业科学院农业资源与农业区划研究所农业微生物资源利用实验室,本项工作中用作阳性对照菌株。植物病原菌西葫芦菌核病菌(核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*)、麦类赤霉病菌(玉米赤霉病菌 *Gibberella zeae*)和棉花黄萎病菌(大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*)由中国农科院农业资源与农业区划研究所牛永春研究员提供。

原始土样 70 份分别采自北京、内蒙古、河北、辽宁、山东、陕西、宁夏、广东、新疆、福建、贵州、四川、黑龙江等 13 个省市自治区,主要取自生长期小麦、水稻、玉米、大豆、油菜、白菜、马铃薯等作物根际。试验所用试剂购自北京化学试剂公司和 Sigma 公司。

1.2 培养基

无氮培养基:蔗糖 10 g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 g、NaCl 0.2 g、 $CaCO_3$ 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、酵母膏 0.5 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1000 mL、pH 7.0~7.2。

DF 培养基^[4]: KH_2PO_4 4.0 g、 Na_2HPO_4 6.0 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、葡萄糖 2.0 g、葡萄糖酸钠 2.0 g、柠檬酸 2.0 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g,组分一、组分二溶液各 0.1 mL、 H_2O 1000 mL、pH 7.2。其中组分一为 H_3BO_3 10 mg、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 11.19 mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 124.6 mg、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 78.22 mg、 MoO_3 10 mg、溶于 100 mL 灭菌蒸馏水中;组分二为 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 mg 溶于 10 mL 灭菌蒸馏水中。

ADF 培养基:将 ACC 溶于超纯水,过滤灭菌,

加到不含 $(NH_4)_2SO_4$ 的灭菌 DF 培养基中,终浓度为 3.0 mmol/L。

无机磷培养基:葡萄糖 10.0 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.03 g、 $Ca_3(PO_4)_2$ 10.0 g、蒸馏水 1000 mL、琼脂 20.0 g、pH 7~7.5。

有机磷培养基:葡萄糖 10.0 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.03 g、 $CaCO_3$ 5.0 g、卵磷脂 0.2 g、蒸馏水 1000 mL、琼脂 20.0 g、pH 7~7.5。

1.3 固氮菌分离及固氮酶活性的测定

固氮菌的分离及固氮酶活性的测定方法详见文献^[5]。

1.4 ACC 脱氨酶阳性菌筛选及活性的测定

1.4.1 阳性菌株筛选 参考 Glick^[4]的方法,把分离到的内生固氮菌,接入 5 mL 液体无氮培养基中,30℃、200 r/min 振荡培养 24 h;吸取上述培养液 0.1 mL 接种至 5 mL DF 培养基振荡培养 24 h;吸取上述培养液 0.1 mL 接种至 5 mL ADF 培养基中振荡培养 24~48 h;将在 ADF 中生长的菌种重复转接、培养,并以 ADF 培养基作为阴性对照,能够以 ACC 为唯一氮源生长的菌株为 ACC 脱氨酶阳性菌株。

1.4.2 ACC 脱氨酶活性测定 参照 Honma^[6]和 Glick 的方法,用 5 mL 无氮液体培养基活化菌株,吸取 0.5 mL 培养液接种到 60 mL 培养液中,30℃培养 24~48 h,4℃、8000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 15 mL 不含 $(NH_4)_2SO_4$ 的 DF 液体培养基离心洗涤菌体 2 次,将菌体重悬于 24 mL ADF 培养基中,30℃培养 24 h,收集并记录菌体重量。用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)离心洗涤菌体 2 次,将菌体平均分在 3 个 EP 管中,-20℃贮存。取贮存菌体重悬于 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6),12000 r/min 离心 5 min 收集菌体,重悬于 600 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)中,加入 30 μ L 甲苯,迅速振荡 30 s 破碎细胞,取 100 μ L 粗酶液 4℃贮存用于测定蛋白浓度;其余粗酶液进行 ACC 脱氨酶活性测定。取粗酶液 200 μ L 加入 0.5 mol/L ACC 20 μ L 混匀,置于 30℃水浴反应 15 min,加入 1 mL 0.56 mol/L HCl 终止反应,12000 r/min 离心 5 min,取上清 1 mL,加入 800 μ L 0.56 mol/L HCl 和 300 μ L 0.2% 2,4-二硝基苯胍溶液(2 mol/L HCl

中溶解),30℃保温 30 min;加入 2 mL 2 mol/L NaOH 混匀,540 nm 测吸光度值。对照 α -酮丁酸标准曲线和蛋白测定标准曲线计算菌株的酶活性。ACC 脱氨酶表示方法为反应条件下,每 mg 菌体蛋白每小时催化 ACC 脱氨形成 α -丁酮酸的 μmol 数,单位是 $[\alpha\text{-丁酮酸 } \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg}), \text{protein}]$ 。蛋白质测定采用比色法,以牛血清白蛋白作为标准物。测定结果为 3 次重复的平均值。

1.5 拮抗病原真菌的测定

采用两点对峙法^[7]。在 PDA 平板上距离中心 2 cm 的两点上分别接种病原真菌(核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、玉米赤霉菌 *Gibberella zeae*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*)和供试菌株。每个实验处理 3 次重复,以只接病原真菌不接固氮菌的平板为对照。28℃恒温培养,15 d 后用毫米刻度尺测量对峙平板上病原真菌沿被测固氮菌方向的菌落半径 r_1 、及对照平板上病原真菌的菌落半径 r_0 。病原真菌生长抑制率(%) = (对照半径 r_0 - 对峙培养病原真菌菌落半径 r_1) / 对照半径 r_0 × 100%。

1.6 nifH 基因扩增分析

方法参考文献[8]。培养供试菌 18 h,挑取少许菌落作为 PCR 模板。正向引物:5'-GGCT-GCGATCC(CGA)AAGGCCGA(CT)TC(CGA)AC-CCG-3'。反向引物:5'-CTG(GCA)GCCTTGTT(CT)TCGCGGAT(CG)GGCATGGC-3'。反应体系:2 × mixTaq 25 uL,引物(20 $\mu\text{mol/L}$)2 uL,模板菌落,用水补到 50 uL 体系。反应程序:95℃变性 1 min、58℃退火 1 min、72℃延伸 1 min,共 35 个循环。DNA 序列分析及同源性分析方法同 16S rDNA。

1.7 溶磷能力的测定

分别采用无机磷培养基和有机磷培养基,将供试菌株点接种于中央,设置 3 个重复,置于 28℃下培养 10 d,观察、测定溶磷圈形成及其直径大小,判断供试菌株的溶磷特性。

1.8 形态、生理生化特征测定

形态及生理生化特征测定方法参考《常见细菌系统鉴定手册》^[9]和《微生物学实验》^[10]。

1.9 菌株 16S rRNA 序列测定、系统发育分析及分类鉴定

16S rRNA 基因扩增序列测定与系统学分析参考文献[11],基因在线比对采用 EzTaxon 和 NCBI 数据库,系统学进化分析采用 Mega 软件系统。

1.10 菌株的碳源利用与抗逆性

1.10.1 碳源利用 将碳源过滤灭菌后加到细菌基础

培养基^[12][(NH_4)₂SO₄ 2.0 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g、NaH₂PO₄ · H₂O 0.5 g、CaCl₂ · 2H₂O 0.1 g、K₂HPO₄ 0.5 g、蒸馏水 1000 mL、琼脂 20 g、pH 值 6.5]中,终浓度为 1%,制成测试平板。培养收集供试菌株菌体,用生理盐水离心洗涤 3 次,调整菌悬液 OD₆₀₀ 为 1.0,每个平板接种 10 μL 菌液,培养、观察,记录生长情况。供试碳源共计 35 种,以葡萄糖为阳性对照,无碳培养基为阴性对照,每个处理 3 次重复。

1.10.2 温度适应性 采用无氮培养基分别在 4℃、28℃、37℃、60℃ 培养、观察、记录菌株的温度适应性,每个处理 3 次重复。

1.10.3 耐盐性 调整无氮培养基 NaCl 浓度分别为 2%、5%、7%、10%,每个处理 3 次重复,培养、观察、记录菌株耐盐性。

1.10.4 耐酸碱性 调整无氮培养基酸度分别为 pH3、pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9、pH10、pH11,每个处理 3 次重复,培养、观察、记录菌株耐酸碱性。

1.11 接种效果试验

方法参考文献[11]。

2 结果与讨论

2.1 固氮菌分离、筛选结果及其固氮酶和 ACC 脱氨酶活性

经过大量的富集培养和分离、纯化,共分离到能够在无氮培养基上生长的分离物 103 株,全部检测到了固氮酶活性;进一步筛选得到 1 株固氮菌具有 ACC 脱氨酶活性,编号为 7037。菌株 7037 的固氮酶活性为 C_2H_4 10.068 ± 1.431 nmol/(h · mg), protein, ACC 脱氨酶活性为 α -丁酮酸 2.530 ± 0.230 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg}), \text{protein}$ 。

就目前检索到的文献资料来看,同时具有固氮酶活性和 ACC 脱氨酶活性的菌株尚未见到报道,从这一点来看,菌株 7037 具有特色。研究表明,ACC 脱氨酶活性为 α -丁酮酸 3.6 ~ 5.2 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg}), \text{protein}$ 的促生细菌已经具有显著增强番茄的抗涝能力^[13],活性为 α -丁酮酸 2.1 ~ 5.0 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg}), \text{protein}$ 的促生细菌已经能够显著增强油菜种子的耐盐性^[14]。本文筛选到的 7037 菌株既有固氮酶活性,又有 ACC 脱氨酶活性,具有很好的促生、抗逆潜能。

2.2 形态生理特征与菌种鉴定

2.2.1 形态及生理生化特征 菌株 7037 在无氮培养基上菌落形态为圆形凸起,乳白色,不透亮,有光泽,表面光滑湿润,边缘整齐;菌体杆状,0.5 μm ×

1.5 ~ 2.5 μm , 无芽孢, 革兰氏阳性。硝酸盐还原阳性, 利用柠檬酸盐, 对糖醇类发酵能力较强, 生理生化特征如表 1 所示。

表 1 固氮菌 7037 菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and chemical characteristics of the strain 7037

生理生化特征 Physiological and chemical characteristic	试验结果 Result	生理生化特征 Physiological and chemical characteristic	试验结果 Result
接触酶反应 Catalase reaction	+	糖醇类发酵产酸 Sugar fermentation	
氧化酶反应 Oxidase reaction	-	D + 葡萄糖 D + glucose	+
VP 反应 VP test	-	D + 蔗糖 D + sucrose	+
吡啶实验 Idol test	+	D + 乳糖 D + lactose	-
明胶液化 Gelaune liquefaction	+	D + 半乳糖 D + galactose	+
淀粉水解 Starch hydrolization	+	D + 核糖 D + ribose	+
卵磷脂酶 Lecithinase test	-	L + 阿拉伯糖 L + arabinose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	D + 果糖 D + fructose	+
甲基红 Methyl red test	-	D + 甘露醇 D + mannitol	+
石蕊牛奶反应 Litmus milk	+	D + 山梨醇 D + sorbitol	-
柠檬酸盐利用 Citrate test	+	D + 麦芽糖 D + maltose	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	D + 纤维二糖 D + cellobiose	+
产二羟基丙酮 Dihydroxyacetone test	-	甘油 Glycerol	+
葡萄糖产气 Gas production on glucose	-		
pH 5.7 生长测定 Growth at pH5.7	+		
0.001% 溶菌酶 Lysozyme test	+		

注 (Note): “+”表示阳性 Positive; “-”表示阴性 Negative.

2.2.2 菌株 16S rRNA 基因比对及菌种鉴定 菌株 7037 的 16S rRNA 基因大小约 1.5 kb (图 1), 测定序列后采用 EzTaxon 和 NCBI 数据库进行 16S rRNA 基因在线比对, 结果显示 7037 菌株与节杆菌属的模式菌株 *Arthrobacter oxydans* DSM20119^T (GenBank: X83408) [15] 序列相似性最高, 达到 99.132%, 与

Arthrobacter scleromae YH-2001^T (GenBank: AF330692) [16] 和 *Arthrobacter polychromogenes* DSM20136^T (GenBank: X80741) [17] 的相似性分别为 99.055% 和 98.698%。根据菌株的形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因比对结果, 参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》[18] 和《常见细菌系统鉴定手册》, 菌株 7037 被鉴定为节杆菌属细菌 (*Arthrobacter* sp.)。目前发现的与 7037 菌株 16S rRNA 序列相似性高于 98% 的模式种共有 9 株, 图 2 显示了它们的系统进化关系。

目前发现的 ACC 脱氨酶阳性菌主要分布在肠杆菌属 (*Enterobacter*) [13]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) [19]、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia*) [20]、粪产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) [21]、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 和固氮螺菌属 (*Azospirillum*) [22]、甲基营养菌属 (*Methylobacterium*) [23]、贪食菌属 (*Variovorax*) [24] 等属中。节杆菌 *Arthrobacter* sp. 7037 可能是这个属第一个被报道的 ACC 脱氨酶阳性细菌。

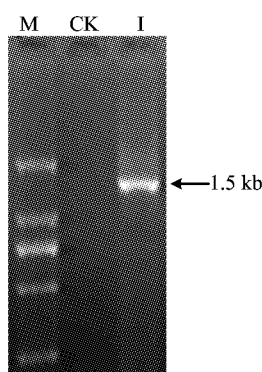


图 1 菌株 7037 的 16S rDNA 电泳图

Fig.1 16S rDNA electrophoresis of the strain 7037

[注 (Note): M—DNA marker; CK—Negative control; I—7037]

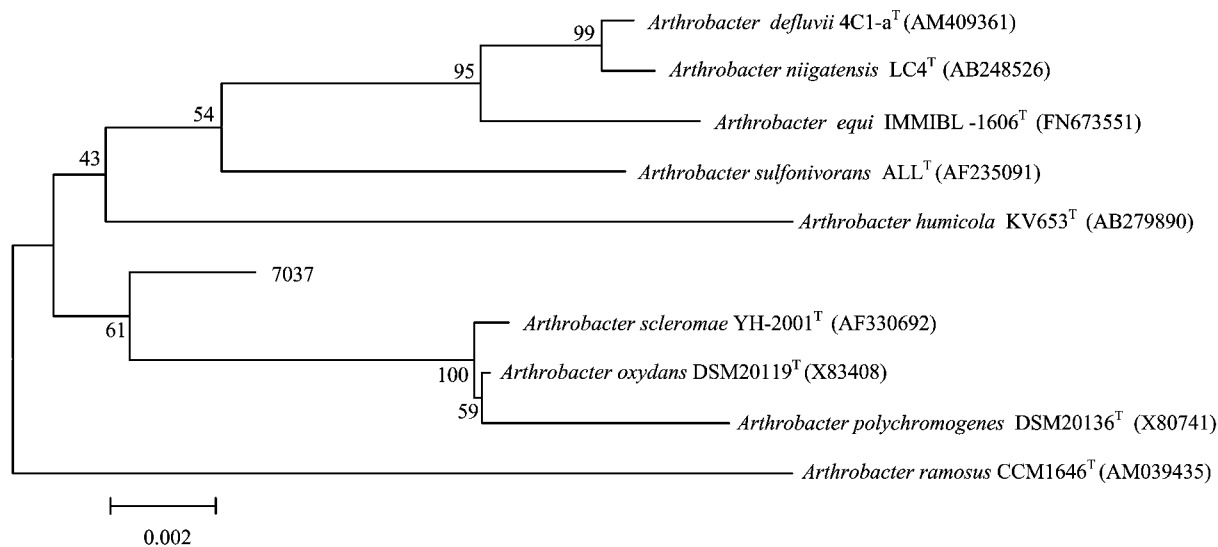


图2 菌株 7037 及其高同源种的系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of the strain 7037 and homologal species

2.3 菌株 7037 对碳源的利用及抗逆性

2.3.1 碳源利用 菌株 7037 可以作为唯一碳源利用的有 L-丙氨酸、γ-氨基丁酸、L-阿拉伯糖、L-天门冬酰胺、D-纤维二糖、糊精、D-果糖、D-半乳糖、甘油、肌醇、麦芽糖、D-甘露醇、D-甘露糖、L-鼠李糖、D-核糖、蔗糖、D-海藻糖、D-木糖、木糖醇等 19 种碳源;不能作为唯一碳源利用的有乙酸、L-天门冬氨酸、苯甲酸、硼酸、溴代丁二酸、以柠檬酸、D-葡萄糖醛酸、L-谷氨酸、乳酸、苹果酸、D-山梨醇、苯丙氨酸、琥珀酸、乳糖、吐温 80 等 15 种碳源。总体来看,菌株 7037 利用碳源的能力相对较强。

2.3.2 环境适应性 在温度适应性方面,菌株 7037 在 50℃ 不生长,可以在 4℃ 缓慢生长,28℃ 是最适生长温度,在 37℃ 生长正常,温度适应范围较大。耐酸碱方面,菌株 7037 在 pH 3 不生长,在 pH 4、5、6、7、8、9、10、11 均可正常生长,适应范围很大。耐盐方面,在含有 2%、5% NaCl 的培养基上生长正常,在含 7%、10% NaCl 的培养基上不生长,耐盐性相对较强。

2.4 接种效果

温室盆栽试验显示,小白菜接种固氮菌 7037 后,

植株生长健壮,叶片大,色泽浓绿,高于无氮对照处理 CK₁ 和有氮对照 CK₂ (图 3)。接种 7037 处理平均植株鲜重为 4.22 g/盆,高于对照组的 1.76 g/盆,与有氮阳性对照处理 4.24 g/盆相当;统计分析显示,接种菌株 7037 试验处理植物鲜重比无氮对照组增加了 139.77%,差异显著(表 2)。

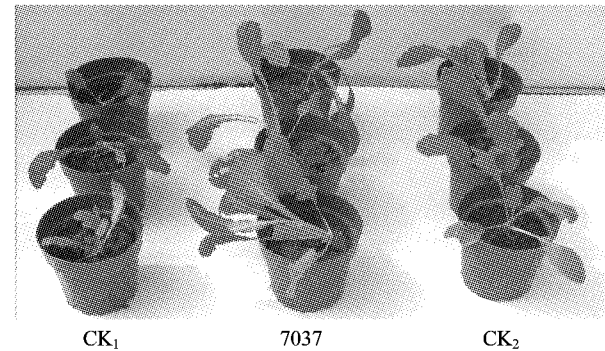


图3 菌株 7037 接种效果试验
Fig. 3 Result of inoculating test with the strain 7037
[注(Note): CK₁—无氮对照 Control without nitrogen;
CK₂—有氮对照 Control with nitrogen]

表 2 菌株 7037 接种效果试验
Table 2 Result of inoculating test with the strain 7037

处理 Treatment	植株鲜重 (g/pot) Fresh weight	鲜重增加 (g/pot) Increase of weight	鲜重增率 (%) Increased rate
无氮对照 Control without nitrogen CK ₁	1.76 ± 0.18 a		
有氮对照 Control with nitrogen CK ₂	4.24 ± 1.03 b	2.48	140.91
菌株 7037 Strain7037	4.22 ± 0.32 b	2.46	139.77

注 (Note): 数据后不同小写字母表示差异达到 5% 显著水平 Values followed by different small letters mean significant at the 5% level.

2.5 *nifH* 基因、溶磷能力及拮抗病原真菌分析测定结果

对菌株 7037 进行了 *nifH* 基因扩增,但没得到 PCR 产物,说明所采用的基因扩增条件不适合菌株 7037。溶磷能力测定显示 7037 不具备溶解有机磷和无机磷的能力。对峙实验显示,7037 不能拮抗植物病原菌西葫芦菌核病菌(核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*)、麦类赤霉病菌(玉米赤霉病菌 *Gibberella zeae*)和棉花黄萎病菌(大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*)。

3 结论

从大量样品中分离、筛选到一株 ACC 脱氨酶阳性固氮菌,编号为 7037,该菌株具有 ACC 脱氨酶活性 α -丁酮酸 $2.530 \mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, protein,固氮酶活性为 C_2H_4 $10.068 \text{ nmol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, protein,被鉴定为节杆菌 *Arthrobacter* sp.。菌株 7037 具有较为广泛的碳源利用能力和很强的环境适应能力,接种小白菜增重效果明显,可望进一步开发成为微生物肥料的生产菌种。

参考文献:

- [1] Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti A S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria(PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2007, 34: 635-648.
- [2] Arshad M, Saleem M, Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation[J]. Trends Biotechnol., 2007, 25(8): 356-362.
- [3] Shaharoon B, Arshad M, Zahir Z A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.) [J]. Lett. Appl. Microbiol., 2006, 42: 155-159.
- [4] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Physiol. Plant, 2003, 118: 10-15.
- [5] 孙建光, 徐晶, 胡海燕, 等. 中国十三省市土壤中非共生固氮微生物菌种资源研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(6): 1450-1465.
Sun J G, Xu J, Hu H Y et al. Collection and investigation on asymbiotic nitrogen-fixing microbial resources [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2009, 15(6): 1450-1465.
- [6] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid[J]. Agric. Biol. Chem., 1978, 42(10): 1825-1831.
- [7] 刘晓光, 高克祥, 谷建才. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35 室内拮抗作用的研究[J]. 林业科学, 1999, 35(5): 57-62.
Liu X G, Gao K X, Gu J C. Testing on the antagonism of the dominant of endophytic fungi from populus tomentosa, chaetomium ND35 in the laboratory[J]. Sci. Silv. Sin., 1999, 35(5): 57-62.
- [8] Ding Y, Wang J, Liu Y, Chen S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region [J]. J. Appl. Microbiol. 2005, 99: 1271-1281.
- [9] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
Dong X Z. Manual of systematic determinative bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
Shen P, Fan X R, Li G W. Microbiology experiment (3rd Ed.) [M]. Beijing: High Education Press, 1999.
- [11] 孙建光, 张燕春, 徐晶, 胡海燕. 高效固氮芽孢杆菌选育及其生物学特性研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2043-2051.
Sun J G, Zhang Y C, Xu J, Hu H Y. Isolation and biological characteristic investigation on efficient nitrogen-fixing bacilli[J]. Sci. Agric. Sin., 2009, 42(6): 2043-2051.
- [12] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
Zhao B, He S J. Microbiology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [13] Grichko V P, Glick B R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria[J]. Plant Physiol. Biochem. 2001, 39: 11-17.
- [14] Jalili F, Khavazi K, Pazira E et al. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonas, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth[J]. J. Plant Physiol. 2009, 166: 667-674.
- [15] Koch C, Schumann P, Stackebrandt E. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the Genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter* [J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1995, 45(4): 837-839.
- [16] Huang Y, Zhao N, He L et al. *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from Human clinical specimens [J]. J. Clin. Microbiol., 2005, 43(3): 1451-1455.
- [17] Kocha C, Rainey F A, Stackebrandt E. 16S rDNA studies on members of *Arthrobacter* and *Micrococcus*: An aid for their future taxonomic restructuring[J]. FEMS Microbiol. Lett., 1994, 123(1-2): 167-171.
- [18] Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology (1st Ed.) [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984-1989.
- [19] Belimov A A, Dodd I C, Safronova V et al. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato[J]. J. Exp. Bot. 2007, 58(6): 1485-1495.
- [20] Onofre-Lemus J, Herná'ndez-Lucas I, Girard L, Caballero-Mel-lado J. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase

- activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants [J]. Appl. Environ. Microbiol. 2009, 75(20): 6581–6590.
- [21] Ghosh S, Penterman J N, Little R D *et al.* Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris* [J]. Plant Physiol. Biochem., 2003, 41: 277–281.
- [22] Blaha D, Combaret C P, Mirza M S, Locozy M. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2006, 56: 455–470.
- [23] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu J, Sa T. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense* [J]. Planta, 2006, 224: 268–278.
- [24] Belimov A A, Safronova V I, Sergeyeva T A *et al.* Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase [J]. Can. J. Microbiol., 2001, 47: 242–252.