

贾凤安,甄丽莎,常帆,等. 黄土高原新造耕地 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(ACCD)活性菌株的筛选及其功能特性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 289-294.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.068

黄土高原新造耕地 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(ACCD)活性菌株的筛选及其功能特性

贾凤安,甄丽莎,常帆,吕睿,刘晨

(陕西省微生物研究所微生物代谢产物研究中心,陕西西安 710043)

摘要:为了筛选性能良好的新造耕地产 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase,简称 ACCD)菌株,对菌株进行多项分类鉴定,分离所产生的 ACCD 菌株并对其性质进行研究。以 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)作为唯一氮源分离纯化普鲁兰酶产生菌,通过形态学鉴定、16S rRNA 序列分析等试验确定菌株的分类地位。通过 Biolog 自动微生物鉴定系统,使用 Gen III 鉴定板进行生理生化测定,以及不同条件下酶活性的检测,研究菌株的产酶特性。通过平皿促生试验,研究菌株不同组分的促生作用。结果表明,从陕北新造耕地样品中分离得到 6 株 ACCD 产生菌,经过多项分类鉴定显示,这些菌株主要分为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*),其中 *Enterobacter* 菌株 YAnl_w2 产酶迅速,在最适温度和 pH 值条件下 ACCD 活性达 $0.54 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ (以单位质量酶蛋白在单位时间内生成 α -丁酮酸的物质的量表示)。促生试验表明,YAnl_w2 对麦种具有明显的促生作用,具有促生应用前景。对 6 株新造耕地分离菌株的多项分类结果鉴定发现,它们均为产 ACCD 的细菌,其中 YAnl_w2 菌株 ACCD 产率、产量较其他来源的酶高,对麦种促生作用明显,具有进一步的研究价值。

关键词:1-氨基环丙烷-1-羧酸;ACC 脱氨酶;新造耕地;根际促生菌;肠杆菌属

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0289-05

黄土高原是全国水土流失较严重的地区之一,自退耕还林还草工程实施以来,黄土高原的植被覆盖度大幅提高,生态环境逐步改善。但是在退耕还林还草工程取得巨大成就的同时,黄土高原地区退耕土地面积已经超出可退耕面积的上限,导致耕地面积减少^[1],农民口粮难以保障^[2]。为有效保障地方粮食生产,巩固退耕还林还草的成效,达到耕地占补平衡的政策目标^[3],陕西省延安市率先开展治沟造地整治工程,以期扩大区域内可耕地的面积。而由治沟造地方式产生的新造耕地,土壤结构已被破坏,肥力低下,难以形成高标准农田,成为制约产量的关键性因素^[4]。

土地土壤的生物指标、化学指标及其物理指标的退化是导致土地土壤质量退化最直接的表现。在逆境条件下,作物会持续产生高浓度的乙烯,对自身的生长造成阻碍。为了减缓这一阻碍效果,需要降低作物体内逆境乙烯的产生量。乙烯生物合成途径中的前体物质 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid,简称 ACC)可在

ACC 脱氨酶(ACC deaminase,简称 ACCD)的作用下被分解为 α -丁酮酸(α -KA)和氨^[5]。而直接产生 ACCD 的植物细胞还未见报道^[6]。植物根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria,简称 PGPR)是一类游离在土壤或共生于植物根系的可促进植物生长及其对矿质营养的吸收和利用,同时能抑制有害生物的有益菌群^[7]。许多 PGPR 可诱导产生 ACCD,因此,具有 ACCD 活性的 PGPR 菌株在促进植株养分吸收^[8]、增加生物量^[9]、促进豆科植物结瘤^[10],以及保护植物免受盐碱^[11]、干旱、真菌及细菌等致病菌^[12]对生长产生的抑制作用方面具有较好的应用前景。

目前,关于 ACCD 活性的 PGPR 菌株研究主要集中在对自然土壤改良和增加肥效方面^[13],对人工干预土地中的原生 PGPR 鲜有报道。本研究通过对延安新造耕地、淤地坝等人工干预土地中 PGPR 菌株筛选、酶活性和促生效果的初步研究,以期寻找具有潜在促生作用的菌株,为延安人造土地提供原生菌种资源,为植物-微生物联合改良土壤研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

样品来源:样品采自陕西省延安市安塞县南沟村新造耕地表层下 15~20 cm 的土壤样本。采用“S”形采样法,每个采样地采集 20 个点,混合土样采用四分法处理保留约 500 g,4℃冰盒保存运输。

1.2 培养基

PAF 培养基(富集培养基):10 g/L 蛋白胨,10 g/L 酪蛋

收稿日期:2016-05-23

基金项目:陕西省科学院科技计划青年人才项目(编号:2015K-21);陕西省科学院青年联合创新项目(编号:2016k-18);陕西省社会发展科技攻关项目(编号:2016SF-450)。

作者简介:贾凤安(1985—),女,陕西西安人,硕士,研究实习员,主要从事微生物肥料及微生物代谢产物相关研究。Tel:(029) 85350847;E-mail:jiafengan@hotmail.com。

通信作者:甄丽莎,博士,助理研究员,主要从事微生物肥料及石油污染土壤修复相关研究。E-mail:zhenlisha2002@163.com。

白水解物, 1.5 g/L MgSO_4 , 1.5 g/L K_2HPO_4 , 10 mL 甘油, pH 值 7.2。

DF 培养基(筛选培养基): 组分(1), 含 10 mg H_3BO_3 , 11.2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 124.6 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 78.2 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg MnO_3 , 将以上成分溶解于 100 mL 无菌水中, 4 ℃ 保存; 组分(2), 含 100 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 将其溶于 10 mL 无菌水中, 4 ℃ 保存。各取 0.1 mL 组分(1)与组分(2)溶液, 再加入 4.0 g/L KH_2PO_4 、6.0 g/L Na_2HPO_4 、0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0 g/L 葡萄糖、2.0 g/L 葡萄糖酸钠、2.0 g/L 柠檬酸、2.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。分离纯化培养基: 在 DF 培养基中添加 20 g 琼脂。

ADF 培养基(加富培养基): 将 ACC 溶于超纯水, 过滤灭菌, 加入到不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的灭菌 DF 培养基中, 终浓度为 3.0 mmol/L。

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

1.3 主要试剂与仪器

ACC, 购自 Sigma 公司; *Taq* 酶及细菌 DNA 提取试剂盒, 购自 TaKaRa 公司。Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机, 购自 Eppendorf 公司; 梯度 PCR 仪, 购自 Biometra 公司; Synergy H1 多功能酶标仪, 购自 BioTek 公司; Gen III Microstation 自动微生物鉴定系统, 购自 Biolog 公司。

1.4 新造土壤中 ACCD 细菌的富集和分离

采用 Penrose 等的方法^[14]并有所改进。称取延安新造耕地土壤样品各 5 g, 分别加入 50 mL 无菌水中, 振荡制成土壤悬浮液, 吸取 1 mL 悬浮液加入 50 mL PAF 培养液中, 28 ℃、200 r/min 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, 在相同条件下培养 24 h 后, 从中吸取 1 mL 菌悬液加入 50 mL ADF 培养液中, 在相同条件下培养 24 h, 用于具有 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 固体平板上, 在 28 ℃ 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 斜面培养基上。

1.5 ACCD 促生活性菌的筛选与鉴定

1.5.1 菌株产 ACCD 活性测定 采用 Penrose 等的方法^[14]并有所改进。(1)将 -80 ℃ 冻存管中保存的菌种接入 5 mL TSB 液体培养基, 扩大培养 24 h 后, 4 ℃、9 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体。用不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 DF 液体培养基离心洗涤菌体 2 次, 重悬于 7.5 mL ADF 培养基中, 28 ℃ 培养 24 h 以诱导其产 ACCD, 4 ℃、9 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体并记录菌体质量。(2)将菌体重悬于 600 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 8.5)中, 加入 30 μL 甲苯, 迅速振荡 30 s, 破碎细胞, 4 ℃ 贮存, 即为粗酶液。(3)取 200 μL 粗酶液放入 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μL 0.5 mol/L ACC 混匀, 于 30 ℃ 水浴 60 min。随即加入 1 mL 0.56 mol/L HCl 终止反应, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。(4)每毫升上清液加入 800 μL 0.56 mol/L HCl 和 300 μL 0.2% 2,4-二硝基苯腈溶液(在 2 mol/L HCl 中溶解), 30 ℃ 保温 30 min。加入 2 mL 2 mol/L NaOH 混匀, 540 nm 处测定吸光度。(5)绘制 α -丁酮酸标准曲线: 配制 10 mmol/L 的 α -丁酮酸, 分别取 0、10、20、40、60、80、100、

120 μL 母液稀释液加入试管中, 用 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.5)补足至 1 mL, α -丁酮酸浓度范围为 0.024 ~ 0.293 $\mu\text{mol/mL}$ 。按步骤(4)操作。ACC 脱氨酶活性以反应体系中 1 mg 酶蛋白 1 h 内生成 α -丁酮酸的物质的量表示, 单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ 。

1.5.2 新造土壤细菌多项分类鉴定及系统发育分析 (1)生理生化鉴定: 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(8 版)^[15]。(2)16S rRNA 序列扩增和序列分析: 菌株在 LB 培养基中于 28 ℃ 振荡培养至对数期, 离心收集菌体, 用 TaKaRa 试剂盒提取 DNA。根据原核生物 16S rRNA 保守序列通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTACC TTGTTACGACTT-3')^[16]进行 16S rRNA 的 PCR 扩增, 采用 50 μL 反应体系, 扩增程序: 95 ℃ 4 min, 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 35 s, 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测定的序列在 GenBank 中用 BLAST 在线软件与已知的 16S rRNA 序列进行同源性分析, 利用 DNASTAR(SeqMan)拼接序列, 并手工适当校正。采用 ClustX 2.1 软件进行多序列比对。用 Mega 7.0 软件包中的 Kimura 2-Parameter Distance 模型进行多序列匹配排列, 用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建 16S rRNA 基因系统发育树。(3)Biolog 自动微生物鉴定: 选择 IF-A 培养液, 利用 Biolog GEN III 细菌鉴定板对微生物进行 94 种表型测试, 微生物在测试板上所显示出的表型指纹被用来在种的水平上鉴定该微生物。

1.6 菌株产 ACCD 的培养条件研究

(1)温度对酶活性的影响: 制得的粗酶液分别在温度为 15 ~ 45 ℃ 条件下加入底物反应 30 min, 测定酶活性; (2)pH 值对酶活性的影响: 设置 pH 值范围为 4.0 ~ 10.0 的处理, 分别用不同 pH 值的缓冲液配制底物和酶液, 测定酶活性。

1.7 菌株促生作用研究

用饱和 NaCl 溶液选种, 挑出饱满完整的麦种, 用 10% H_2O_2 表面消毒 5 min, 蒸馏水漂洗 4 ~ 5 次晾干备用。以无菌水作为对照, 分别用促生菌株菌体重悬液、发酵液、离心后的上清浸麦种 24 h, 将不同处理的麦种置于装有湿润滤纸的无菌培养皿中, 放入 28 ℃ 光照培养箱内, 定期观察种子萌发情况, 5 d 后测量麦种的根长、茎长, 用以表征促生作用。

2 结果与分析

2.1 ACC 脱氨酶活性菌株筛选

采样地地理信息: 36°35'N, 109°17'E, 海拔 1 212 m; 采样点 YA-1 种植玉米, 为 1 年新造耕地混合土样; 采样点 YA-2 种植白菜, 为平整 1 月新造耕地混合土样; 采样点 YA-3 为淤地坝混合土样, 种植樱桃。

利用 ADF 筛选培养基从 3 份混合土样中共分离到 43 株菌株, 根据菌落颜色、形态、大小、长势等特征初步去重得到 18 株菌株。根据 Penrose 等以 ACC 脱氨酶活性不低于 20 nmol/(mg · h) 作为筛选指标, 得到 6 株 ACCD 活性较高的菌株^[14]。

6 株菌在 ADF 培养基经 5 次传代后仍正常生长, 表明它们有产 ACCD 的能力。从表 1 可以看出, 6 株菌的酶活性差异较大, 其中 YAnl_w2、YAnl_ty7、YAnl_011 ACCD 活性分别

为 (0.291 ± 0.010) 、 (0.185 ± 0.021) 、 (0.136 ± 0.015) $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$, 其中 YAnl_w2 酶活性最高。

表 1 新造耕地分离菌株及相关筛选指标

菌株编号	采样地编号	菌株形态	ACC D 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$]
YAnl_011	YA-3	浅黄色, 近圆形, 不光滑, 长势弱	0.136 ± 0.015
YAnl_t2	YA-2	白色, 圆形, 不光滑, 长势强	0.067 ± 0.013
YAnl_ty5	YA-2	白色, 近圆形, 不光滑, 长势中	0.038 ± 0.007
YAnl_ty7	YA-1	类白色, 近圆形, 不光滑, 长势弱	0.185 ± 0.021
YAnl_w1	YA-3	浅黄色, 近圆形, 不光滑, 长势中	0.085 ± 0.003
YAnl_w2	YA-1	白色, 近圆形, 光滑, 长势强	0.291 ± 0.010

注: 表中的数据表示为“ $\bar{x} \pm s$ ”。

由图 1 可以看出, 培养 8 h 后, 所有 6 株菌株在 ACC 诱导下均进入对数生长期, 36 h 后所有菌株均到达稳定期, 说明各菌株在 ADF 中均生长较快。而 YAnl_w2 相比于其他菌株, 在 24 h 左右即进入稳定期, 且 $D_{600 \text{ nm}}$ 为 0.88, 高于其他 5 株菌, 说明该菌株在 6 株菌中长势最好。

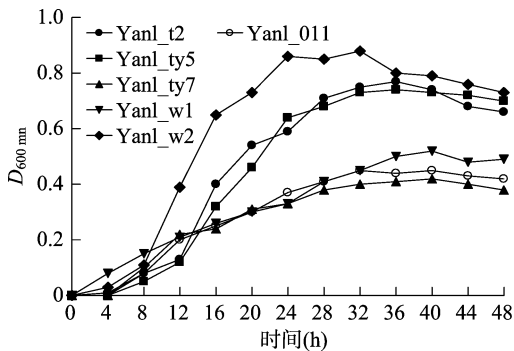


图 1 新造耕地分离菌株生长曲线

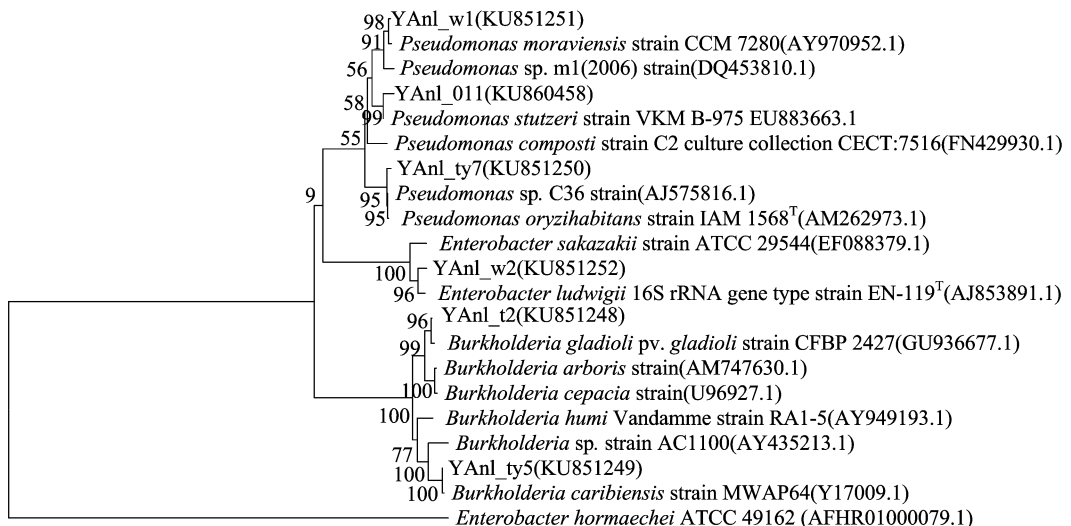
2.2 菌株 16S rRNA 基因序列的测定、Biolog 细菌鉴定以及系统发育分析

从延安安塞南沟村新造耕地初步分离后经初步筛选, 得

到 6 株具有产 ACCD 活性的细菌, 经 DNA 提取和 16SrRNA 基因序列扩增、测序, 由图 2 可以看出, 6 株菌主要分为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)。结果表明, 南沟村新造耕地具 ACCD 活性细菌多样性并不丰富, 本试验中只筛选到 3 属共 6 株产 ACCD 细菌。研究表明, 假单胞菌属作为土壤常驻细菌在生物防治^[17]、促生作用^[18]方面有巨大潜力。而肠杆菌属是近年来发现的具有 ACCD 活性的促生菌^[19], 同时可产生吲哚乙酸 (IAA)、铁载体等物质^[20]。此外, 发现分泌 ACCD 的伯克氏菌属^[21]对番茄^[22]、小麦^[23]、茶叶^[24]等农作物均有促生作用。

经 MEGA 7 构建 Neighbor-Joining 系统进化树分析 (图 2) 以及在 NCBI 数据库、StrainInfo 数据库中进行有效种 16S rRNA 基因序列相似性检索后发现, 在假单胞菌属中, YAnl_w1 与 *Pseudomonas moraviensis* strain CCM 7280 (AY970952.1) 的相似性为 98%, YAnl_011 与斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) strain VKM B-975 (EU883663.1) 的相似性为 99%, YAnl_ty7 与假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) C36 strain (AJ575816.1) 的相似性为 99%, 但与栖稻假单胞菌 (*Pseudomonas oryzae*) strain IAM 1568T (AM262973.1) 的进化距离较远, 还需要进一步确定其进化关系。肠杆菌属中, YAnl_w2 与路德维希肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*) strain EN-119T (AJ853891.1) 的序列相似性为 99%, 表明 YAnl_w2 属于肠杆菌属 (*Enterobacter*)。伯克氏菌属 YAnl_t2 与 *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* strain CFBP 2427 (GU936677.1) 的相似性为 98%, YAnl_ty5 与 *Burkholderia caribensis* strain MWAP64 (Y17009.1) 的序列相似性为 100%, 表明 YAnl_t2 和 YAnl_ty5 属于伯克霍尔德菌 (*Burkholderia*)。

如表 2 所示, YAnl_w2 细菌 DIST < 5.0 (3.899), SIM > 0.75 (0.873), 属于良好匹配, YAnl_w2 细菌是 *Enterobacter cloacae* ss *dissolvens* 的可能性为 92.7%。结果还显示, 菌株



0.050
Pseudomonas sp.—假单胞菌属; *Pseudomonas stutzeri*—斯氏假单胞菌; *Pseudomonas oryzae*—栖稻假单胞菌; *Enterobacter sakazakii*—阪崎肠杆菌; *Enterobacter ludwigii*—路德维希肠杆菌; *Burkholderia cepacia*—洋葱伯克霍尔德菌; *Burkholderia* sp.—伯克霍尔德氏菌属; *Enterobacter hormaechei*—霍氏肠杆菌

图 2 以新造耕地分离菌株 16S rRNA 序列为基础的系统发育树

表 2 YAnl_w2 细菌 Biolog 鉴定结果

编号	可能性 (PROB)	相似性 (SIM)	位距 (DIST)	生物体类型	物种
1	0.927	0.873	3.899	GN - Ent	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>dissolvens</i>
2	0.061	0.037	5.640	GN - Ent	<i>Raoultella planticola</i> / <i>ornithinolytica</i>
3	0.007	0.004	7.038	GN - Ent	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>
4	0.005	0.003	7.247	GN - Ent	栖冷克吕沃尔菌 (<i>Khuyvera cryocrescens</i>)

注:GN - Ent 是 Biolog 微生物鉴定系统直接输出的结果,表示肠道菌。

YAnl_w2 对蔗糖、水苏糖、 α -D-乳糖等多种寡糖,对 D-山梨醇、D-甘露醇、肌醇等醇类,对 D-丝氨酸、L-丝氨酸、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸等氨基酸,以及对乳酸、柠檬酸、乙酸、L-苹果酸等短链酸呈阳性反应,其中能利用柠檬酸、乙酸为肠杆菌属 (*Enterobacter*) 典型反应^[15]; *Enterobacter* 属利用明胶速度慢^[15],亦表现为阴性反应。综上所述, YAnl_w2 表现为典型的 *Enterobacter* 属特征。最终确定细菌的分类地位,仍需要通过各自形态特征、生理生化与化学分类特征及近缘菌株 DNA - DNA 同源性结果来判断。

2.3 YAnl_w2 性质及促生作用

2.3.1 YAnl_w2 产酶条件初步研究 研究表明,肠杆菌属是一类产 ACCD 且具有促生潜力的细菌^[25],同时具有耐盐^[26]、耐重金属^[27]等优良特性,研究 YAnl_w2 菌株生长条件,对其酶学性质、优化产酶条件有重要意义。根据“2.1”节的

试验结果,对酶活性最高、具有应用潜力的 YAnl_w2 菌产酶条件进行初步研究。

由图 3 - a 可以看出, YAnl_w2 细菌 ACCD 和底物反应时,温度和 pH 值的变化对 ACCD 活性影响较大。在温度较低(15℃)时,几乎没有酶活性,而随着温度的上升,酶活性逐渐升高,在 30℃时, YAnl_w2 酶活性最高,而随着温度继续上升,酶活性呈下降趋势,但 37℃时 ACCD 活性仍约为最高酶活性的 40%。

由图 3 - b 可以看出,在 30℃体系中, YAnl_w2 的 ACCD 最适 pH 值为 7.0[酶活性为 0.54 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$], pH 值从 4.0 开始酶活性逐渐升高, pH 值达到 7.0 后酶活性随着 pH 值的升高而逐渐下降。pH 值在 6.0 ~ 7.0 之间时, YAnl_w2 拥有较高的酶活性,表明 YAnl_w2 分泌的 ACCD 可能是一类中性酶。

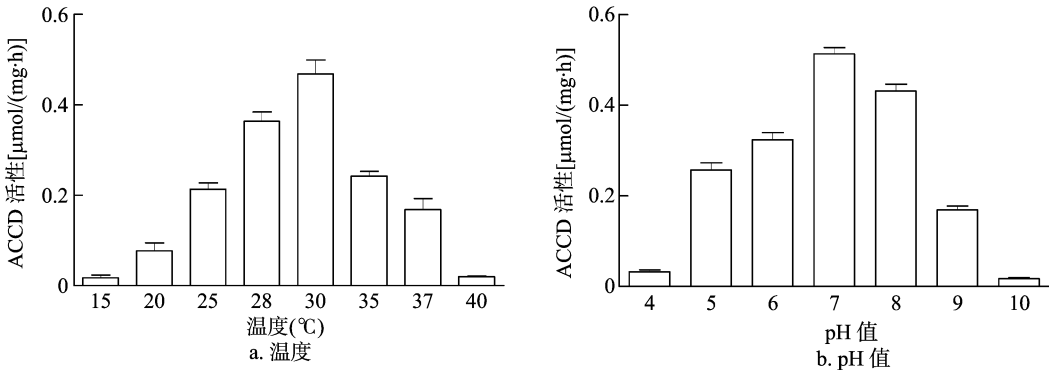


图3 YAnl_w2 肠杆菌不同温度、pH 值下的酶活性

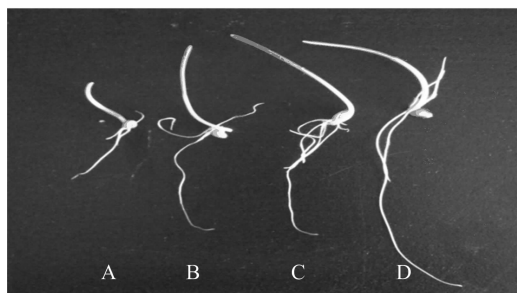
2.3.2 YAnl_w2 的促生作用 由图 4 可见,与无菌水浸种对比, YAnl_w2 的各组分均有促生长作用,其中发酵液对麦种促生作用与 CK 相比,对麦种根长、茎长的促生作用显著,其次为菌体重悬液。菌体重悬液促生效果明显优于发酵液上清,说明细菌 YAnl_w2 通过附着在根系表面,可能在 ACCD 作用下吸收植物生成的 ACC,从而达到促生效果;同时 YAnl_w2 可能还拥有其他促生因子。有报道指出,除产生 ACCD 外,肠杆菌可能还具有清除活性氧自由基等快速调节机制,从而对植株产生抗逆和促生的作用^[28],因此发酵液上清亦有促生效果,它对 YAnl_w2 的促生作用之后将进一步研究。

3 结论

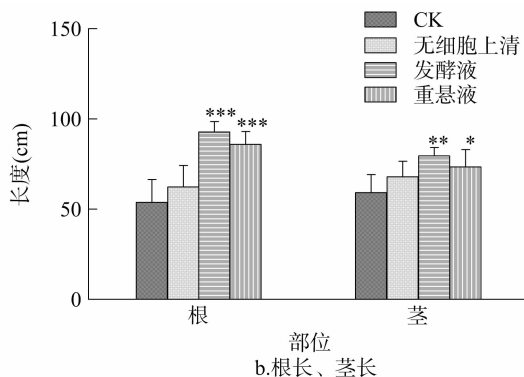
目前,人们对产 ACCD 的 PGPR 菌株已进行了大量报道。该菌株作为土壤改良剂、微生物活菌制剂等对土壤的改良正在成为土壤改良的研究热点^[29-30]。具有 ACCD 活性的 PGPR

作用于其根际区域的生态位,利用与宿主植物的共生作用对环境胁迫条件作出响应^[28,31],同时通过风力、雨水等作用在地表和地下以游离形式运动,从而降低地区植株根际乙烯水平,减轻逆境胁迫环境对作物的不利影响^[32]。

本研究以 ACC 为唯一氮源,采用富集定向筛选方法,从陕西延安新造耕地土壤中分离到 6 株具有 ACC 脱氨酶活性的植物促生菌,并测定了 ACC 脱氨酶活性,分析了 16S rDNA 序列及其进化地位。本研究发现 1 株酶活最高、具有潜在应用价值的细菌 YAnl_w2,研究发现该菌株可能产中温中性 ACCD,酶活性最高可达 0.54 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$;同时发现, YAnl_w2 及其分泌的物质均对麦种产生促生效果,提示除 ACCD 外可能还有其他促生机制。 YAnl_w2 分离自延安地区新造耕地土壤,相较于其他来源的微生物制剂,对当地环境具有更好的适应性。今后,有待深入关于该菌株的促生作用以及相关微生物肥料的研究。



A—无菌水对照组; B—离心后上清;
C—菌体重悬液; D—发酵液
a. 平皿促生试验结果



“*” “**” “***” 分别表示与对照在0.05、0.01、0.001水平上差异显著

图4 YAnI_w2 处理麦种平皿促生试验对比

参考文献:

- [1] Liu Q, Wang Y, Zhang J, et al. Filling gullies to create farmland on the loess plateau [J]. Environ Sci Technol, 2013, 47 (14): 7589 – 7590.
- [2] Lv Y H, Fu B J, Feng X M, et al. A Policy – driven large scale ecological restoration: quantifying ecosystem services changes in the Loess Plateau of China [J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e31782.
- [3] 2014 中国国土资源公报 (摘登) [N]. 中国国土资源报, 2015 – 04 – 22 (3).
- [4] 蔡艳蓉, 李永红, 高照良. 黄土高原地区土地资源分区研究 [J]. 农业灾害研究, 2015, 5 (5): 38 – 47, 53.
- [5] Glick B R, Penrose D M, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth – promoting bacteria [J]. J Theor Biol, 1998, 190 (1): 63 – 68.
- [6] Glick B R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 251 (1): 1 – 7.
- [7] Ahmed A, Hasnain S. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria [J]. Pol J Microbiol, 2014, 63 (3): 261 – 266.
- [8] 刘艳萍, 滕松山, 赵蕾. 高产嗜铁素恶臭假单胞菌 A3 菌株的鉴定及其对黄瓜的促生作用 [J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17 (6): 1507 – 1514.
- [9] 史照涵, 刘佳莉, 方芳, 等. 含 ACC 脱氢酶的 PGPR 在植物抗非生物胁迫中的作用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28 (27): 1 – 4.
- [10] 窦雅静, 康丽华, 陆俊锐, 等. 黑木相思根瘤菌 ACC 脱氢酶活性的研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 34 (11): 77 – 83.
- [11] Bal H B, Nayak L, Das S, et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress [J]. Plant and Soil, 2013, 366 (1/2): 93 – 105.
- [12] Nascimento F X, Vicente C S L, Barbosa P, et al. Evidence for the involvement of ACC deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 in the biocontrol of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. BioControl, 2013, 58 (3): 427 – 433.
- [13] Gamalero E, Glick B R. Bacterial modulation of plant ethylene levels [J]. Plant Physiol, 2015, 169 (1): 13 – 22.
- [14] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase – containing plant growth – promoting rhizobacteria [J]. Physiol Plant, 2003, 118 (1): 10 – 15.
- [15] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 450.
- [16] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173 (2): 697 – 703.
- [17] Wintermans P C A, Bakker P A H M, Pieterse C M J. Natural genetic variation in Arabidopsis for responsiveness to plant growth – promoting rhizobacteria [J]. Plant Mol Biol, 2016, 90: 623 – 634.
- [18] Kumar M, Mishra S, Dixit V, et al. Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Plant Signal Behav, 2016, 11 (1): e1071004.
- [19] Penrose D M, Glick B R. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase – containing plant growth – promoting bacteria [J]. Can J Microbiol, 2001, 47 (4): 368 – 372.
- [20] Yaish M W, Antony I, Glick B R. Isolation and characterization of endophytic plant growth – promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107 (6): 1519 – 1532.
- [21] Sun L N, Wang X H, Li Y. Increased plant growth and copper uptake of host and non – host plants by metal – resistant and plant growth – promoting endophytic bacteria [J]. Int J Phytoremediation, 2016, 18 (5): 494 – 501.
- [22] Onofre – Lemus J, Hernandez – Lucas I, Girard L, et al. 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.
- [23] Shaharoona B, Jamro G M, Zahir Z A, et al. Effectiveness of various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* containing ACC – deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17 (8): 1300 – 1307.
- [24] Dutta J, Handique P J, Thakur D. Assessment of culturable tea rhizobacteria isolated from tea estates of Assam, India for growth promotion in commercial tea cultivars [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1252.
- [25] Jha C K, Annapurna K, Saraf M. Isolation of rhizobacteria from *Jatropha curcas* and characterization of produced ACC deaminase [J]. J Basic Microbiol, 2012, 52 (3): 285 – 295.

刘彦伶,李 渝,张雅蓉,等. 长期不同施肥处理对黄壤性水稻土理化性质的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(19):294-298.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.069

长期不同施肥处理对黄壤性水稻土理化性质的影响

刘彦伶¹, 李 渝¹, 张雅蓉¹, 张文安¹, 黄兴成¹, 蒋太明^{1,2}

(1. 贵州省农业科学院农业资源与环境研究所/农业部贵州耕地保育与农业环境科学观测实验站, 贵州贵阳 550006;

2. 贵州省农业科学院, 贵州贵阳 550006)

摘要:依托国家黄壤肥力与肥效长期定位试验,研究连续施肥 18 年后,不同施肥处理对西南黄壤性水稻土土壤质地、容重、总孔隙度、阳离子交换量(CEC)、pH 值、有机质、氮、磷、钾等土壤理化性质的影响。研究表明,长期不施肥土壤容重、孔隙度、阳离子交换量与初始值无明显差异,而土壤养分含量基本呈下降趋势;长期单施化肥土壤容重比试验初始值增加 5.1%,土壤孔隙度降低 2.1 百分点,土壤物理性质有变劣趋势,土壤 pH 值也显著低于其他处理,除土壤磷素养分明显增加外,有机质、氮、钾等其他土壤养分基本呈下降趋势;常规有机肥(M)、常规有机肥+常量氮磷钾肥(MNPK)处理黏粒含量显著降低且沙粒含量显著提高,土壤质地由黏土转变成壤质黏土,土壤容重比单施化肥处理分别降低 15.9%、18.1%,土壤孔隙度显著提高。长期施用有机肥可显著提高土壤阳离子交换量(CEC)、pH 值及其他土壤养分,与试验初始值相比,MNPK 处理土壤 CEC、pH 值、有机质、全氮、全磷分别提高 9.9%、5.0%、29.6%、35.2%、52.6%;长期施用绿肥效果虽不如有机肥,但也可在一定程度上改善土壤理化性质;长期不同施肥处理土壤全钾含量均比试验初始值下降 9.1%~19.5%,在实际生产中应重视钾肥的施用。在西南黄壤性水稻土上化肥与有机物料配施尤其是与畜禽有机肥配施对改善土壤理化性质效果最佳。

关键词:黄壤性水稻土;长期施肥;土壤理化性质

中图分类号: S157.4⁺1;S153

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)19-0294-05

施肥是农业生产中作物获得高产的必要措施。目前,盲目施用化肥的现象仍普遍存在,不仅造成养分大量流失、肥料利用率低下,还造成土壤板结、酸化及严重的环境污染问题^[1-2]。施用有机肥可改善土壤微生物环境,提高土壤肥力

和肥料利用率,是作物增产和地力培肥的重要措施^[3-4]。但有机肥肥效慢、养分含量低,短期内难以满足作物对养分的需求,因此需要与化学肥料配合施用,才能达到缓急相济、互相补充及提高肥料肥效的目的^[5-6]。土壤的物理性状主要通过影响土壤水、气、热进而影响土壤肥力,而土壤化学性质则是土壤肥力水平的重要体现。因此,土壤的物理性质和化学性质彼此相互影响、关系密切,二者可综合反映土壤的质量水平^[7]。长期定位施肥在研究土壤肥力演化、肥料效应、农田养分循环以及施肥与环境关系等方面具有重要价值,因而关于长期施肥对土壤理化性质的影响已成为研究的热点。黄壤是中国南方山区的主要土壤类型之一,主要分布于贵州省、四川省以及云南省、广西壮族自治区等地。贵州省黄壤面积达 703.8 万 hm²,占全国黄壤总面积的 30.27%,其质地黏重,土壤淋溶强,盐基饱和度低且酸性较强,严重制约着农作物产量

收稿日期:2016-05-12

基金项目:贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2017]2852);贵州省农业科学院科技创新专项(黔农科院科技创新[2017]06号);国家自然科学基金(编号:41461069);贵州省科技厅省院联合基金(编号:黔科合 LH 字[2015]7079号)。

作者简介:刘彦伶(1989—),女,贵州安顺人,硕士研究生,研究实习员,主要从事土壤养分研究。E-mail:lyl890615@163.com。

通信作者:蒋太明,博士,研究员,主要从事土壤养分和土壤水分研究。E-mail:jtm532@163.com。

[26] Kim K, Jang Y J, Lee S M, et al. Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants[J]. Mol Cells, 2014, 37(2): 109-117.

[27] Li Y, Wang Q, Wang L, et al. Increased growth and root Cu accumulation of *Sorghum sudanense* by endophytic *Enterobacter* sp. K3-2: implications for *Sorghum sudanense* biomass production and phytostabilization[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2016, 124: 163-168.

[28] Kim K, Jang Y J, Lee S M, et al. Alleviation of salt stress by enterobacter sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants[J]. Mol Cells, 2014, 37(2): 109-117.

[29] Molineux C J, Connop S P, Gange A C. Manipulating soil microbial communities in extensive green roof substrates[J]. Sci Total Environ, 2014, 493: 632-638.

[30] Rashad F M, Saleh W D, Moselhy M A. Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1. Composting, quality, stability and maturity indices[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(15): 5952-5960.

[31] Hassan W, Bano R, Bashir F, et al. Comparative effectiveness of ACC-deaminase and/or nitrogen-fixing rhizobacteria in promotion of maize (*Zea mays* L.) growth under lead pollution[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2014, 21(18): 10983-10996.

[32] 魏素娜. 小麦根际具有 ACC 脱氢酶活性细菌菌株的分离、鉴定及接种效应的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2011.