

doi: 10.11838/sfsc.1673-6257.22004

三株产 ACC 脱氨酶的植物根际促生菌产酶条件优化及促生作用研究

孙庆培^{1, 2}, 樊永红^{1, 2*}, 李佩琪^{1, 2}, 秦新政³

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2. 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046; 3. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 为提高植物根际促生菌 (PGPR) 菌株产 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶的能力, 对 3 株 PGPR 菌株进行了最佳产酶条件优化及玉米促生试验。在单因素试验的基础上, 研究了 pH、温度、ACC 底物浓度、NaCl 浓度、摇床转速对 ACC 脱氨酶比活力的影响, 以 pH、温度、ACC 底物浓度为主要因素, 进行响应面最佳产酶工艺优化。最终得到 W5 菌株的产酶条件为 pH 8、温度 32 ℃、ACC 脱氨酶底物浓度 6.0 mmol/L; BS2-2 菌株的产酶条件为 pH 10、温度 30 ℃、ACC 脱氨酶底物浓度 6.0 mmol/L; 5# 菌株产酶条件为 pH 9、温度 30 ℃、ACC 脱氨酶底物浓度 6.0 mmol/L; 较未优化前酶比活力分别提高了 6.6、2、4 倍。在盆栽试验中, W5 菌株促生效果最为显著。利用高产 ACC 脱氨酶的 PGPR 能够促进玉米生长, 可为制作为微生物复合菌剂奠定基础。

关键词: ACC 脱氨酶; PGPR; 响应面; 玉米促生

近年来, 随着全球气候的变化, 植物在盐碱、干旱、重金属等非生物胁迫环境下的生长受到抑制, 导致粮食减产, 造成巨大损失^[1-4]。植物根际促生菌 (PGPR) 能够促进植物的生长, 是替代传统农业、增加农业产量的一种可持续农业方法^[5]。PGPR 通过植物激素的产生、固氮作用的增强、磷酸盐的增溶和铁载体的生成等各种机制直接或间接地影响植物生长^[6]。1-氨基环丙烷-1-羧酸 (简称 ACC) 是植物体内乙烯激素的前体, ACC 脱氨酶可将 ACC 以根系分泌物的形式分解成氨和 α -丁酮酸, 以减少乙烯的生成。对植物的生理、生长和发育产生影响, 因此, ACC 脱氨酶在当今农业发挥着关键作用^[7]。

研究表明产 ACC 脱氨酶的 PGPR 可通过微生物代谢提供营养, 缓解逆境胁迫, 促进植物生长^[8-11]。具有 ACC 脱氨酶特性的 PGPR 菌株能够降低盐碱环境对水稻的胁迫, 高盐浓度下水稻的丙二醛 (MDA) 含量显著降低, 叶绿素、脯氨酸、可溶性糖的含量升高^[12]。在干旱条件下, 接种含有 ACC 脱氨酶的 PGPR 的叶片乙烯排放显著

低于未接种的植株, 降低植物中 ACC 和乙烯的水平^[13]。研究评估在温室条件下, 接种产 ACC 脱氨酶的 PGPR 可缓解盐和铝对玉米根系伤害的能力, 促进玉米生长, 结果显示所有生长参数均有所改善^[14]。此外具 ACC 脱氨酶的 PGPR 制成的复合微生物菌剂以联合形式处理植株, 可显著降低乙烯水平, 提高植株的生长指标和生理指标, 缓解在逆境下的胁迫损伤^[15-16]。

目前研究主要集中在 ACC 脱氨酶对植物促生作用的影响。但作为一种关键酶, 通过优化产 ACC 脱氨酶菌株的条件, 进而使产 ACC 脱氨酶菌株能够高产以达到更好的促生效果鲜有报道。因此, 本研究对 3 种菌株产 ACC 脱氨酶的条件进行优化并通过盆栽试验验证, 以期提高各菌株的产酶能力, 应用于逆境中植物促生, 也可制作成复合菌剂, 为高效生物菌剂肥料的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株为乳酪短杆菌 (*Brevibacterium casei*) W5、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) BS2-2、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 5#, 菌株由本实验室从盐穗木根际土壤中分离鉴定并进行保藏。供试玉米品种为黄糯 626。

收稿日期: 2022-01-05; 录用日期: 2022-03-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31560032)。

作者简介: 孙庆培 (1996-), 在读硕士研究生, 研究方向为环境微生物学。E-mail: 1841499091@qq.com。

通讯作者: 樊永红, E-mail: yhfanzhb2004@163.com。

1.2 方法

1.2.1 ACC 脱氨酶酶比活力的测定

参照 Penrose 等^[17]的方法对 PGPR 菌株进行 α -丁酮酸测定, 参照 Bradford^[18]的方法进行牛血清蛋白的测定。通过 α -丁酮酸及蛋白质标准曲线计算出 ACC 脱氨酶的含量。

1.2.2 PGPR 酶比活力的单因素优化

以菌株产 ACC 脱氨酶酶比活力为响应指标, 对不同 pH (7、8、9、10、11)、温度 (28、30、32、34、36 °C)、ACC 底物浓度 (3.0、6.0、9.0、12.0、15.0 mmol/L)、转速 (150、160、170、180、190 r/min)、NaCl 浓度 (2%、4%、6%、8%、10%) 进行试验条件的优化。

1.2.3 PGPR 产 ACC 脱氨酶条件的响应面优化

在单因素的基础上选择 3 个对 ACC 脱氨酶酶比活力有显著影响的 3 个因素, 进行 Box-Behnken 设计分析响应面试验, 因素水平分布见表 1。

表 1 响应面优化 W5、BS2-2、5# 菌株产 ACC

脱氨酶编码因素水平

水平	pH			温度 (°C)			ACC 底物浓度 (mmol/L)		
	A _{W5}	A _{BS2-2}	A _{5#}	B _{W5}	B _{BS2-2}	B _{5#}	C _{W5}	C _{BS2-2}	C _{5#}
-1	7	8	8	30	28	28	3.0	3.0	3.0
0	8	9	9	32	30	30	6.0	6.0	6.0
1	9	10	10	34	32	32	9.0	9.0	9.0

注: A_{W5}、B_{W5}、C_{W5} 为 W5 菌株的 pH、温度、ACC 底物浓度; A_{BS2-2}、B_{BS2-2}、C_{BS2-2} 为 BS2-2 菌株的 pH、温度、ACC 底物浓度; A_{5#}、B_{5#}、C_{5#} 为 5# 菌株的 pH、温度、ACC 底物浓度。

1.2.4 菌液的配制及玉米种子消毒

3 菌株经活化后, 根据响应面优化各菌株培养的条件, 再培养 24 h, 进行菌液离心, 用无菌水重悬菌体, 调至 OD₆₀₀ 为 0.5, 制成菌悬液备用。选择饱满无破损的黄糯 626 玉米种子, 参照姬文秀等^[19]的方法进行种子消毒, 种子用无菌水冲洗 4 ~ 5 次后, 用 75% 酒精浸泡 5 min, 再用 4% NaClO 浸泡 3 min, 后用无菌水冲洗 6 ~ 7 次。

1.2.5 盆栽试验促生评价

参照 Anumita 等^[20]的方法, 种子在以无菌土壤为基质的穴盘生长, 光照强度 4000 Lux, 光照 16 h, 黑暗条件 8 h, 温度在 28 ~ 30 °C 之间, 长至三叶期。移栽进装有 1.5 kg 灭菌土壤的盆内, 盆直径 20 cm, 每盆一株幼苗, 7 d 后进行第一次菌液施入, 每次 5 mL, 浇灌于玉米根际, 每隔 3 d 一次, 土壤相对

湿度保持在 70%。设置无菌水对照组 (CK) 及 3 个单菌试验组, 共 4 个处理组, 每个处理 5 次重复。30 d 后测定玉米幼苗的株高、茎粗、根长、鲜重、干重、叶绿素含量。

1.2.6 数据分析

运用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 进行数据分析, Design-Expert 11 进行响应面优化, Graphpad Prism 8 进行作图。

2 结果与分析

2.1 初始酶比活力结果

如图 1 所示, W5 菌株初始酶比活力为 0.908 U/mg, BS2-2 菌株初始酶比活力为 1.398 U/mg, 5# 菌株初始酶比活力为 0.994 U/mg。

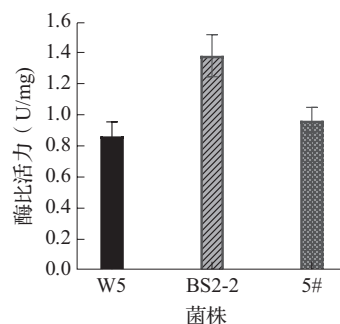


图 1 W5、BS2-2、5# 菌株初始 ACC 脱氨酶酶比活力

2.2 单因素试验结果

2.2.1 pH 对菌株产 ACC 脱氨酶酶比活力的影响

如图 2 所示, 菌株 W5 在 pH 为 8 时 ACC 脱氨酶酶比活力为 1.849 U/mg, 达到最大值。随着 pH 值的升高酶比活力逐渐下降, 在 pH 为 11 时酶比活力最低, 为 0.187 U/mg; 菌株 BS2-2 和菌株 5# 酶比活力变化趋势一致: pH 为 7~9 时酶比活力逐渐升高, 在 pH 为 9 时酶比活力值最大, 为其最适培养 pH, 随后逐渐下降。BS2-2 菌株最高酶比活力为 1.885 U/mg, 5# 菌株最高酶比活力为 1.592 U/mg。

2.2.2 温度对菌株产 ACC 脱氨酶酶比活力的影响

如图 3 所示, W5 菌株酶比活力先升高, 在 32 °C 时酶比活力达到最大值, 为 1.202 U/mg, 之后酶比活力逐渐下降。BS2-2 和 5# 菌株在 30 °C 下酶比活力最高, 分别为 1.994 和 1.467 U/mg, 之后随着温度的升高酶比活力逐渐下降。

2.2.3 ACC 底物浓度对菌株产 ACC 脱氨酶酶比活力的影响

如图 4 所示, 3 株 PGPR 在 ACC 底物浓度为

6.0 mmol/L 时, ACC 脱氨酶酶比活力最高, 酶比活力依次为 1.785、2.497、2.094 U/mg, 即为随着底物浓度的增加酶比活力逐渐降低。

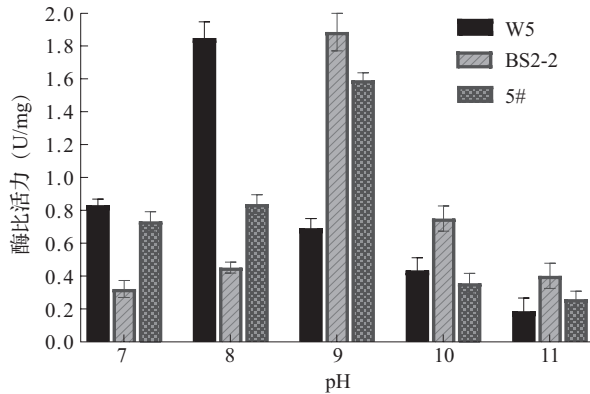


图2 pH对W5、BS2-2、5#菌株产ACC脱氨酶酶比活力的影响

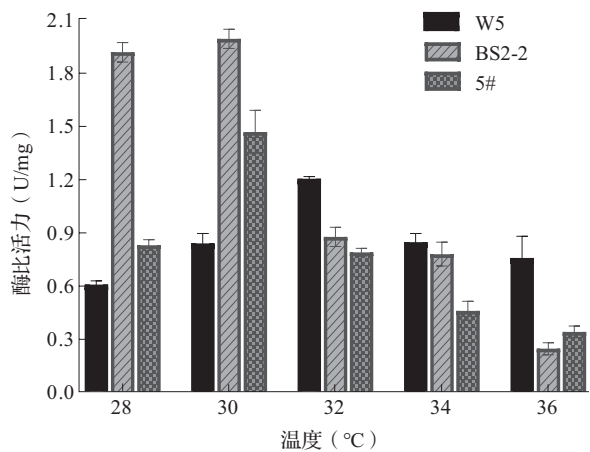


图3 温度对W5、BS2-2、5#菌株产ACC脱氨酶酶比活力的影响

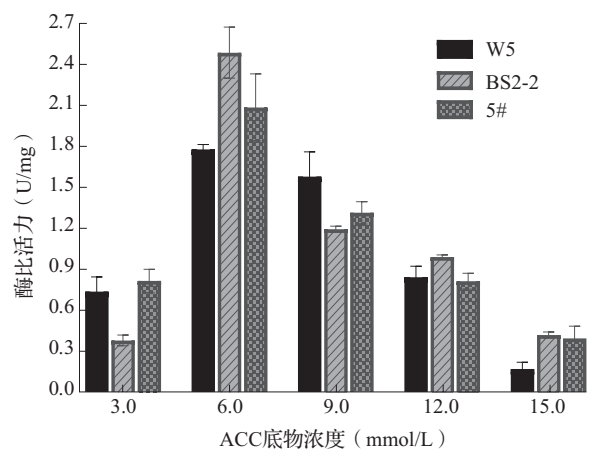


图4 ACC底物浓度对W5、BS2-2、5#菌株产ACC脱氨酶酶比活力的影响

2.2.4 NaCl 浓度和转速对菌株产 ACC 脱氨酶酶比活力的影响

如图5、6所示, 3株菌在NaCl浓度为2%时酶比活力最大, 分别为0.845、1.305、0.797 U/mg, 后随着NaCl浓度的升高, 酶比活力显著下降, 在NaCl浓度为10%时, 酶比活力最低。NaCl浓度的升高显著抑制了ACC脱氨酶的酶比活力, 转速对菌株酶比活力影响不显著。

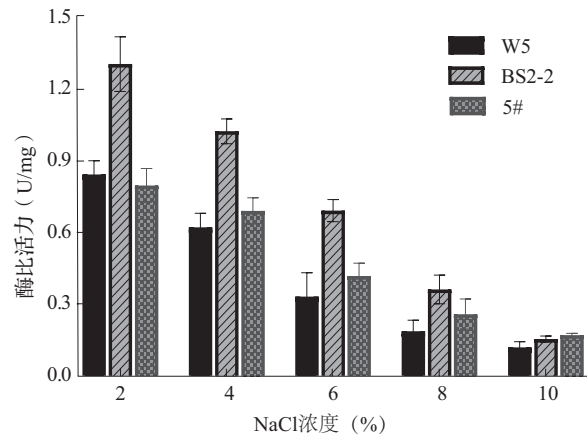


图5 NaCl浓度对W5、BS2-2、5#菌株产ACC脱氨酶酶比活力的影响

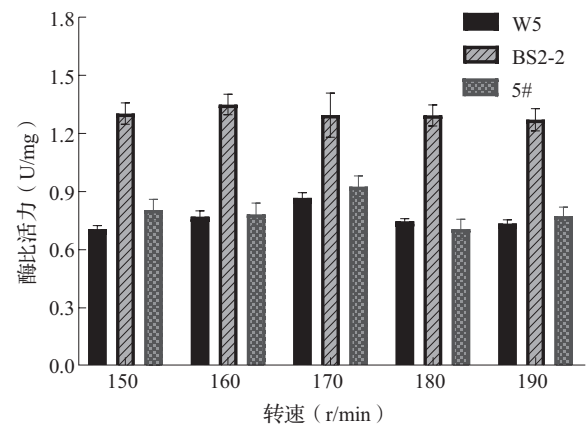


图6 转速对W5、BS2-2、5#菌株产ACC脱氨酶酶比活力的影响

2.3 响应面试验结果

2.3.1 响应面模型建立及方差分析

在5个单因素的基础上选择对响应值 (ACC脱氨酶酶比活力) 有显著影响的3个因素 pH、温度、ACC底物浓度进行试验, 并对数据进行拟合 (表2)。

W5菌株的回归方程为:

$$Y_{W5} = -639.6401 + 62.25092A_{W5} + 25.22549B_{W5} - 3.26735C_{W5} + 0.05025A_{W5}B_{W5} + 0.076583A_{W5}C_{W5} +$$

$0.144542B_{W5}C_{W5}-4.00755A_{W5}^2-0.412137B_{W5}^2-0.1577C_{W5}^2$

BS2-2 菌株的回归方程为:

$Y_{BS2-2}=-258.75642+8.95455A_{BS2-2}+14.27019B_{BS2-2}+82.72583C_{BS2-2}-0.005375A_{BS2-2}B_{BS2-2}+2.54167A_{BS2-2}C_{BS2-2}-0.075B_{BS2-2}C_{BS2-2}-0.42285A_{BS2-2}^2-0.238275B_{BS2-2}^2-843.4444C_{BS2-2}^2$

5# 菌株的回归方程为:

$Y_{5\#}=-439.79805+47.99692A_{5\#}+15.04269B_{5\#}+207.98C_{5\#}+0.08825A_{5\#}B_{5\#}+0.891667A_{5\#}C_{5\#}-1.64583B_{5\#}C_{5\#}-2.83260A_{5\#}^2-0.2649B_{5\#}^2-1329.2778C_{5\#}^2$

表 2 响应面优化 W5、BS2-2、5# 菌株产 ACC 脱氨酶
试验设计与结果

序号	pH		温度	ACC 底物浓度	酶比活力 (U/mg)		
	A	B			W5	BS2-2	5#
1	-1	-1	0	0.39	0.39	1.47	
2	0	-1	1	2.02	1.45	3.29	
3	0	0	0	6.23	2.89	4.73	
4	0	1	-1	2.28	1.04	1.68	
5	-1	1	0	0.71	0.12	0.71	
6	1	-1	0	0.34	3.06	0.44	
7	0	0	0	6.00	2.91	5.13	
8	0	0	0	6.22	2.96	4.70	
9	1	0	1	0.34	3.29	0.44	
10	0	0	0	5.98	2.98	4.43	
11	-1	0	-1	0.51	0.41	0.84	
12	0	1	1	4.57	1.10	2.26	
13	0	0	0	5.97	3.03	4.24	
14	1	1	0	0.26	2.75	0.39	
15	1	0	-1	0.43	2.95	0.31	
16	0	-1	-1	3.19	1.38	2.32	
17	-1	0	1	1.34	0.45	0.87	

各菌株回归方程方差分析结果如表 3 ~ 5 所示。3 菌株响应模型皆为 $P<0.0001$ ，模型极显著。3 菌株的失拟项分别为 0.0605、0.4902、0.4702， $P>0.05$ 不显著，表明模型合理，拟合度高，建立的模型有意义，能够很好地预测优化 ACC 脱氨酶比活力的最适条件。W5 菌株的 $R^2=0.9963>0.9$ ，校正决定系数 ($\text{adj } R^2$) = 0.9914；BS2-2 菌株的 $R^2=0.999>0.9$ ， $\text{adj } R^2=0.9978$ ；5# 菌株的 $R^2=0.9863>0.9$ ， $\text{adj } R^2=0.9641$ ，说明模型相关性较好。3 菌株的信噪比分别为 33.7815、74.1047、17.5436，都大于 4，说

明试验设计可靠，可信度高。 F 值反应各因素对酶比活力的影响程度，则各因素在 W5 菌株中影响力大小为温度 > ACC 底物浓度 > pH，在 BS2-2 菌株中影响力大小为 pH > 温度 > ACC 底物浓度，在 5# 菌株中影响力大小为温度 > pH > ACC 底物浓度。

表 3 响应面优化 W5 菌株产 ACC 脱氨酶方差分析

方差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	99.41	9	11.05	206.71	<0.0001	**
A_{W5}	0.3124	1	0.3124	5.85	0.0462	*
B_{W5}	0.4451	1	0.4451	8.33	0.0234	*
C_{W5}	0.4409	1	0.4409	8.25	0.0239	*
$A_{W5}B_{W5}$	0.0404	1	0.0404	0.76	0.4134	
$A_{W5}C_{W5}$	0.2111	1	0.2111	3.95	0.0872	
$B_{W5}C_{W5}$	3.01	1	3.01	56.3	0.0001	**
A_{W5}^2	67.62	1	67.62	1265.55	<0.0001	**
B_{W5}^2	11.44	1	11.44	214.15	<0.0001	**
C_{W5}^2	8.48	1	8.48	158.73	<0.0001	**
残差	0.3740	7	0.0534			
失拟项	0.3046	3	0.1015	5.85	0.0605	
净误差	0.0694	4	0.0174			
总离差	99.78	16				

$R^2=0.9963$; $\text{adj } R^2=0.9914$; 信噪比 = 33.7815

注：* 表示对结果影响显著 ($P<0.05$)；** 表示对结果影响极显著 ($P<0.01$)。下同。

表 4 响应面优化 BS2-2 菌株产 ACC 脱氨酶方差分析

方差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	22.23	9	2.47	803.63	<0.0001	**
A_{BS2-2}	14.25	1	14.25	4635.25	<0.0001	**
B_{BS2-2}	0.2007	1	0.2007	65.28	<0.0001	**
C_{BS2-2}	0.0329	1	0.0329	10.70	0.0136	*
$A_{BS2-2}B_{BS2-2}$	0.0005	1	0.0005	0.1504	0.7097	
$A_{BS2-2}C_{BS2-2}$	0.0233	1	0.0233	7.57	0.0285	*
$B_{BS2-2}C_{BS2-2}$	0.0001	1	0.0001	0.0264	0.8756	
A_{BS2-2}^2	0.7529	1	0.7529	244.94	<0.0001	**
B_{BS2-2}^2	3.82	1	3.82	1244.40	<0.0001	**
C_{BS2-2}^2	2.43	1	2.43	789.37	<0.0001	**
残差	0.0215	7	0.0031			
失拟项	0.0090	3	0.0030	0.9678	0.4902	
净误差	0.0125	4	0.0031			
总离差	22.25	16				

$R^2=0.999$; $\text{adj } R^2=0.9978$; 信噪比 = 74.1047

表 5 响应面优化 5# 菌株产 ACC 脱氨酶方差分析

方差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	50.38	9	5.60	48.78	<0.0001	**
A _{5#}	0.6676	1	0.6676	5.82	0.0466	*
B _{5#}	0.7769	1	0.7769	6.77	0.0353	*
C _{5#}	0.3647	1	0.3647	3.18	0.1178	
A _{5#} B _{5#}	0.1246	1	0.1246	1.09	0.3320	
A _{5#} C _{5#}	0.0029	1	0.0029	0.0249	0.8790	
B _{5#} C _{5#}	0.0390	1	0.0390	0.3399	0.5782	
A _{5#} ²	33.78	1	33.78	294.40	<0.0001	**
B _{5#} ²	4.73	1	4.73	41.19	0.0004	**
C _{5#} ²	6.03	1	6.03	52.51	0.0002	**
残差	0.8033	7	0.1148			
失拟项	0.3493	3	0.1164	1.03	0.4702	
净误差	0.4540	4	0.1135			
总离差	51.18	16				

$R^2=0.9863$; adj $R^2=0.9641$; 信噪比 = 17.5436

2.3.2 响应面三维图分析

图 7 ~ 9 为利用 Design-Expert 11 对响应面分析的结果。如图 7 所示, W5 菌株酶比活力随着 pH、温度及 ACC 底物浓度的升高出现先升高后降低的趋势, 产酶交互作用中, 当等高线的形状越接近于椭圆

圆形时, 各因素交互作用越显著, 接近于圆形时, 交互作用不显著。由 A、B、C 交互作用图可以看出 pH 与温度、pH 与 ACC 底物浓度的等高线凸起且呈椭圆形, 说明其交互作用显著, 而温度与 ACC 底物浓度的等高线接近于圆形, 说明二者的交互作用不显著。如图 8 所示, BS2-2 菌株响应面图 D、E、F 中 pH 与温度、pH 与 ACC 底物浓度及温度与 ACC 底物浓度等高线接近于椭圆形, 交互作用显著。如图 9 所示, 5# 菌株 G、H、I 交互作用图中, 两因素之间等高线都接近椭圆, 交互作用显著。

2.3.3 模型的预测和验证

用 Design Expert 11 进行模型预测, 结果显示: W5 菌株酶比活力最高点所对应的条件为 pH 8.0292, 温度 32.2048 °C, ACC 脱氨酶底物浓度为 6.34824 mmol/L, 此时酶比活力预测值为 6.1103 U/mg。结合实际情况最佳参数修正为 pH 8.0, 温度 32 °C, ACC 脱氨酶底物浓度为 6.0 mmol/L, 此时酶比活力值为 5.98 U/mg, 与预测值接近, 模型可靠。预测 BS2-2 菌株的酶比活力最佳参数为 pH 10.0, 温度 29.82 °C, ACC 脱氨酶底物浓度为 6.0 mmol/L, 此时的酶比活力为 3.88 U/mg。结合实际情况, 将温度修正为 30 °C。此时的 ACC 脱氨酶酶比活力值达到 3.73 U/mg, 模型可靠。预测 5# 菌株的酶比活力最佳参数为

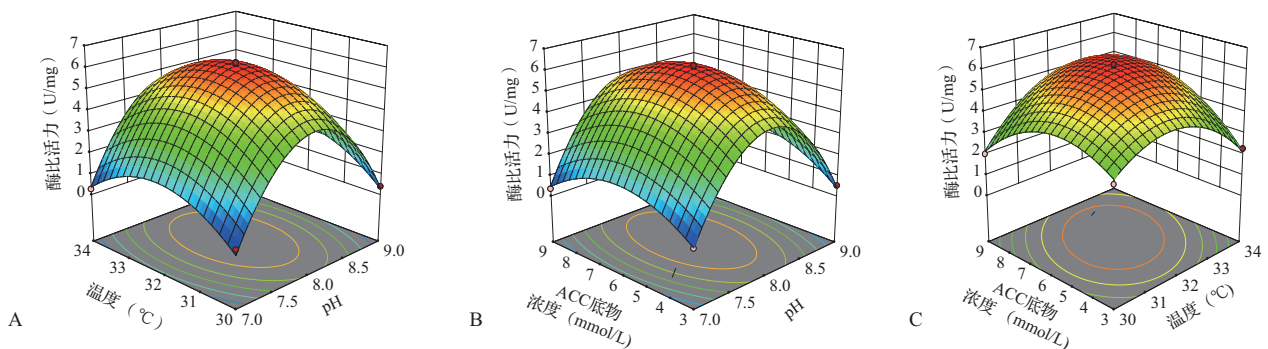


图 7 各因素对 W5 菌株产 ACC 脱氨酶的交互作用影响

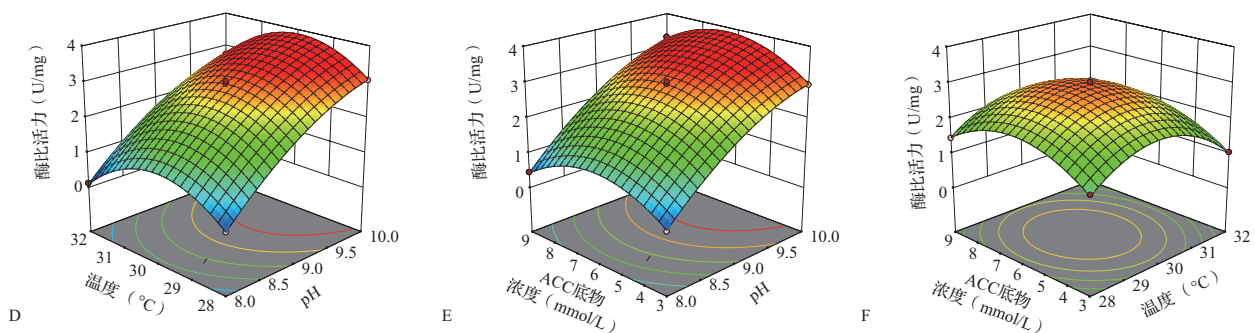


图 8 各因素对 BS2-2 菌株产 ACC 脱氨酶的交互作用影响

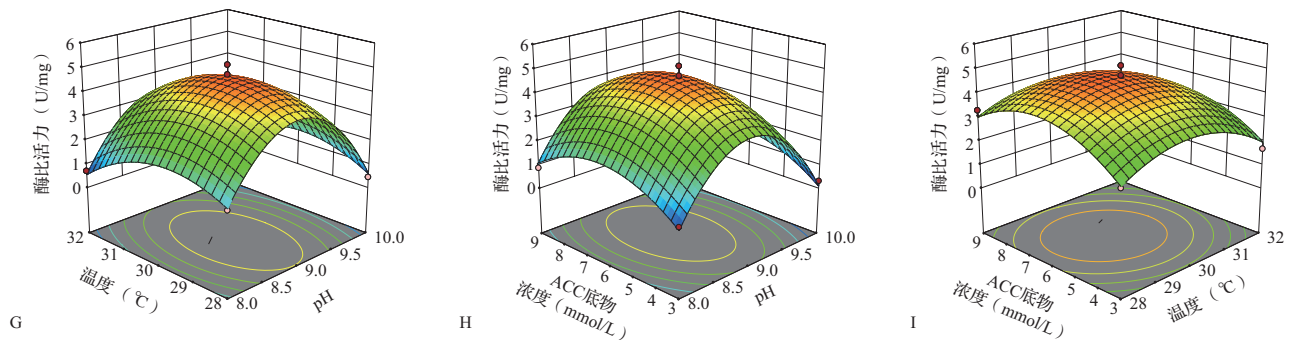


图9 各因素对5#菌株产ACC脱氨酶的交互作用影响

pH 8.94473, 温度 29.6875 ℃, ACC 脱氨酶底物浓度为 6.28642 mmol/L, 预测酶比活力为 4.68667 U/mg。结合实际情况, 调整为 pH 为 9.0, 温度 30℃, ACC 脱氨酶底物浓度为 6.0 mmol/L。此时的 ACC 脱氨酶酶比活力达到 4.432 U/mg, 模型可靠。

2.4 3 种菌株玉米促生效果评价

玉米盆栽试验表明, 3 种菌株施入玉米根际后显著促进了玉米生长。如表 6 所示, 施用 3 株菌株的玉

米幼苗各项生长指标均显著高于对照组 ($P<0.05$)。W5 菌株的促生效果最为显著, 株高、茎粗、根长、鲜重、干重、叶绿素含量比不加菌的对照分别提高 77.35%、55.87%、300.03%、85.58%、139.05%、60.49%。施入 BS2-2 菌株后玉米生长指标比对照组分别提高 61.23%、32.87%、216.76%、68.12%、79.05%、26.85%。施入 5# 菌株后玉米各指标与对照组相比分别提高 65.42%、46.37%、249.2%、82.41%、101.90%、42.90%。

表 6 3 种菌剂对玉米幼苗促生作用的影响

处理	株高 (cm)	茎粗 (mm)	根长 (cm)	鲜重 (g/盆)	干重 (g/盆)	叶绿素 (mg/g)
CK	25.43 ± 0.32c	3.58 ± 0.14d	5.23 ± 0.11c	2.52 ± 0.28c	0.35 ± 0.04c	1.08 ± 0.14d
BS2-2	41.00 ± 0.70b	4.76 ± 0.16c	16.57 ± 0.35b	4.24 ± 0.12b	0.63 ± 0.07b	1.37 ± 0.03c
5#	42.07 ± 0.06b	5.24 ± 0.09b	18.26 ± 0.31b	4.60 ± 0.06a	0.71 ± 0.03b	1.54 ± 0.03b
W5	45.10 ± 1.05a	5.58 ± 0.21a	21.06 ± 1.90a	4.68 ± 0.05a	0.84 ± 0.05a	1.73 ± 0.12a

注: 不同小写字母表示不同菌种处理下差异显著 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 单因素对菌株 ACC 脱氨酶酶比活力产生的影响

本试验 3 菌株的 ACC 脱氨酶均随着 pH 的升高酶比活力逐渐下降, W5 菌株在 pH 为 8、BS2-2 和 5# 菌株在 pH 为 9 时酶比活力最大, 可能是由于不同菌株耐受 pH 范围不同, ACC 脱氨酶酶比活力在中性偏碱的环境下较高。这与梁烨等^[21]发现产 ACC 脱氨酶的菌株 *V. paradoxus* 5C-2 可耐受 pH 为 8.12 的环境下提高了大豆的生物量、总根长度以及叶绿素含量、樊永红等^[22]发现菌株 D8 最适 pH 为 9.0 时适合细菌生长结果一致。在温度对酶比活力产生的影响中, W5 菌株在 32℃、BS2-2 及 5# 菌株在 30℃ 时酶比活力最高, 为菌株最适温度。可能是 ACC 脱氨酶酶比活力会随着温度的升高而升高, 但温度过高也会抑制酶的活性。这与沈萍等^[23]发现底物 ACC 诱导菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶, 温度上升到 5℃ 后

ACC 脱氨酶开始被诱导, 30℃ 时为最适温度的结果一致。在 ACC 底物浓度对酶比活力影响中, ACC 底物浓度达到 6.0 mmol/L 时, 诱导后酶比活力达到最大值。可能是不同菌株产生 ACC 脱氨酶所需要的底物浓度会不同。这与 Tittabutr 等^[24]发现当底物 ACC 浓度 ≥ 1.5 mmol/L 时根瘤菌 TAL1145 才能被诱导结果一致。此外, 孙兰平^[25]从芍药根际土壤分离具 ACC 脱氨酶活性的 PGPR, 回接进芍药根际进行促生作用测定, 各项生长和生理指标高于不接菌的对照, ACC 脱氨酶酶比活力最高为 0.661 U/mg, 略低于本实验酶比活力水平。利用响应面法优化 ACC 脱氨酶菌株后, 酶比活力达到一个较高的水平, 得到高产酶条件, 更好地发挥菌株的促生能力。

3.2 具 ACC 脱氨酶活性的菌株对植物促生作用的影响

优化 ACC 脱氨酶 PGPR 菌株显著促进了玉米的生长, 尤其是施入 W5 菌液后玉米的株高、茎

粗、根长、鲜重、干重、叶绿素含量比对照分别提高 77.35%、55.87%、300.03%、85.58%、139.05%、60.49%。此外,具 ACC 脱氨酶菌株的促生作用已在玉米、小麦、水稻、菜豆等植物中有较多报道。姚强等^[26]将小麦种子浸泡在菌液中,其芽长和根长与不接菌相比提高了 20% ~ 26%。另外, Gupta 等^[27]发现将产 ACC 脱氨酶的菌株联合处理能够降低胁迫下的乙烯水平,增加了菜豆幼苗的根长(110%)、根鲜重(45%)、芽长(60%)、芽鲜重(255%)、根生物量(220%)、芽生物量(425%)和总叶绿素含量(57%)。因此具 ACC 脱氨酶特性的菌株制备复合菌剂可作为生物菌肥应用于农业生产,增加粮食产量,进行土壤改良^[28-30]。本次研究中 3 株高产 ACC 脱氨酶 PGPR 菌株不仅可单独作为高效的生物菌剂施用,还可以联合处理制备成混合菌剂,应用于农田,促进植物生长。

4 结论

本研究对 3 株 PGPR 进行了产酶优化,得到高产 ACC 脱氨酶菌株。其中 W5 菌株最佳产酶条件为 pH 8、温度 32 ℃、ACC 脱氨酶底物浓度 6.0 mmol/L,酶比活力为 5.98 U/mg,与未优化前相比提高约 6.6 倍。BS2-2 菌株的优化参数 pH 10、温度 30℃、ACC 脱氨酶底物浓度 6.0 mmol/L,酶比活力为 3.73 U/mg,与未优化前提高约 2 倍。5# 菌株优化参数为 pH 9、温度 30℃、ACC 脱氨酶底物浓度 6.0 mmol/L,酶比活力为 4.432 U/mg,与未优化前相比提高约 4 倍。利用高产酶比活力菌株进行盆栽试验,玉米的生长指标及叶绿素含量显著高于不加菌的对照组,因此高产 ACC 脱氨酶 PGPR 菌株有作为微生物菌剂的潜力,能够促进植物生长。

参考文献:

- [1] Shahid M, Ameen F, Maheshwari H S, et al. Colonization of *Vigna radiata* by a halotolerant bacterium *Kosakonia sacchari* improves the ionic balance, stressor metabolites, antioxidant status and yield under NaCl stress [J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 158 (79): 103809-103816.
- [2] Saikia J, Sarma R K, Dhandia R, et al. Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 1-16.
- [3] Zainab N, Din B U, Javed M T, et al. Deciphering metal toxicity responses of flax (*Linum usitatissimum* L.) with exopolysaccharide and ACC-deaminase producing bacteria in industrially contaminated soils [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 152 (49): 90-99.
- [4] Naamala J, Smith D L. Relevance of plant growth promoting microorganisms and their derived compounds, in the face of climate change [J]. *Agronomy*, 2020, 10 (8): 1179-1205.
- [5] Akhtar T, Kumar S, Kumar S, et al. Importance of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture: a review [J]. *Quarterly Research Journal of Plant & Animal Sciences/Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 2020, 35 (16): 89-102.
- [6] Raghuwanshi R, Prasad J K. Perspectives of rhizobacteria with ACC deaminase activity in plant growth under abiotic stress [J]. *Springer International Publishing Root Biology*, 2018, 5 (16): 303-321.
- [7] Murali M, Gowtham H G, Singh S B, et al. Bio-prospecting of ACC deaminase producing rhizobacteria towards sustainable agriculture: A special emphasis on abiotic stress in plants [J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 168 (69): 104142-104149.
- [8] Jha C K, Sharma P, Shukla A, et al. Microbial enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase: an elixir for plant under stress [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2021, 156 (79): 101664-101674.
- [9] 王凯, 孙星星, 秦光蔚, 等. 我国土壤改良修复工程技术研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2021, 49 (20): 40-48.
- [10] 潘晶, 黄翠华, 彭飞, 等. 植物根际促生菌诱导植物耐盐促生作用机制 [J]. *生物技术通报*, 2020, 36 (9): 75-87.
- [11] 王琪媛, 王甲辰, 叶磊, 等. 含 ACC 脱氨酶的根际细菌提高植物抗盐性的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2021, 37 (2): 174-186.
- [12] 高洁云. 东乡野生稻内生根际细菌多样性及具 ACC 脱氨酶活性菌株筛选 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2017.
- [13] Saleem A R, Brunetti C, Khalid A, et al. Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria [J]. *Plos One*, 2018, 13 (2): 191-198.
- [14] Zerrouk I Z, Rahmoune B, Khelifi L, et al. Algerian Sahara PGPR confers maize root tolerance to salt and aluminum toxicity via ACC deaminase and IAA [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41 (6): 91-98.
- [15] 黄文茂, 易伦, 彭思云, 等. PGPR 复合菌剂对辣椒生长及根际土壤微生物结构的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, 2020 (1): 195-201.
- [16] 黄书超, 侯栋, 岳宏忠, 等. 三株促生菌及其混合微生物菌剂对茼蒿生长和品质的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2021, 33 (7): 1212-1221.
- [17] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. *Physiologia plantarum*, 2003, 118 (1): 10-15.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1-2): 248-254.

- [19] 姬文秀, 李虎林, 冷雪, 等. 产 ACC 脱氨酶人参内生细菌的分离和促生特性分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41 (2): 168–174.
- [20] Anumita S, Pallab K G, Krishnendu P, et al. A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress [J]. Research in Microbiology, 2018, 169 (20): 20–30.
- [21] 梁焯, 何楚婷, 杨悦, 等. 碱胁迫条件下含 ACC 脱氨酶的根际细菌对大豆生长的影响 [J]. 生物技术通报, 2020, 36 (9): 100–108.
- [22] 樊永红, 史长鑫, 王杰, 等. 新疆盐穗木根际耐盐碱菌株生物学特性的初步研究 [J]. 中国土壤与肥料, 2020 (5): 258–261.
- [23] 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 [J]. 南京师大学报 (自然科学版), 2008, 31 (1): 104–108.
- [24] Tittabutr P, Awaya J D, Li Q X, et al. The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31 (2): 141–150.
- [25] 孙兰平. 芍药根际微生物多样性及具 ACC 脱氨酶活性的促生菌研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [26] 姚强, 董晓霞, 宫志远. 滨海盐碱地产 ACC 脱氨酶细菌的筛选及根际促生研究 [J]. 山东农业科学, 2020, 52 (2): 54–58.
- [27] Gupta S, Pandey S. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10 (20): 1506–1512.
- [28] 曹桂林. 植物根际促生菌和微生物肥料研究进展浅析 [J]. 南方农业, 2020, 52 (2): 54–58.
- [29] 顾金凤. 微生物菌肥对盐渍化土壤的改良研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [30] 武杞蔓, 张金梅, 李玥莹, 等. 有益微生物菌肥对农作物的作用机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2021, 37 (5): 221.

Optimization of enzyme-producing conditions and probiotic effect of three strains of ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria

SUN Qing-pei^{1, 2}, FAN Yong-hong^{1, 2*}, LI Pei-qi^{1, 2}, QIN Xin-zheng³ (1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830046; 2. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi Xinjiang 830046; 3. Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi Xinjiang 830091)

Abstract: In order to improve the ability of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains to produce ACC deaminase, three PGPR strains were optimized for optimal enzyme production process and maize proliferation experiments. Based on the single-factor experiment, the effects of pH, temperature, ACC substrate concentration, NaCl concentration and shaker speed on the enzyme activity of ACC deaminase were investigated, and the optimal enzyme production process was optimized in response surface with pH, temperature and ACC substrate concentration as the main factors. The final enzyme production conditions were pH 8, temperature 32 °C, ACC deaminase substrate concentration 6.0 mmol/L for W5; pH 10, temperature 30 °C, ACC deaminase substrate concentration 6.0 mmol/L for strain BS2-2; pH 9, temperature 30 °C, ACC deaminase substrate concentration 6.0 mmol/L for strain 5#. The enzymatic activity was 6.6, 2 and 4-fold higher than that before optimization. In the pot experiment, the W5 strain was the most effective in promoting growth. The use of PGPR with high ACC deaminase production can promote maize growth, which can lay the foundation for making as microbial compound.

Key words: ACC deaminase; PGPR; response surface; maize proliferation