

# ACC 脱氨酶活性细菌 XG32 的鉴定

刘维红<sup>1</sup>, 闫淑珍<sup>1</sup>, 刘五星<sup>2</sup>, 杨启银<sup>1</sup>

(1 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

(2 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008)

[摘要] 采用生理生化、Biolog 和 16S rDNA 序列同源性分析 3 种方法, 对一株分离自植物根际的具 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) 脱氨酶活性的细菌菌株 XG32 进行了鉴定, 比较了 3 种方法在最后确定种属上的重要性. 研究认为通过生理生化和 16S rDNA 序列同源性分析可将菌株 XG32 鉴定到种, 确定该菌株为荧光假单胞菌生物型 (*Pseudomonas fluorescens* biovar ).

[关键词] ACC 脱氨酶, 菌种, 鉴定

[中图分类号] Q939 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)02-0081-03

## Identification of ACC Deaminase-Containing Rhizobacterium XG32

Liu Weihong<sup>1</sup>, Yan Shuzhen<sup>1</sup>, Liu Wuxing<sup>2</sup>, Yang Qiyin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract** Classical physiological and biochemical methods, Biolog and 16S rDNA sequential analysis are used to identify the ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) deaminase-containing rhizobacterium XG32. These three methods are compared in importance of identifying bacteria. The results indicate that the strain XG32 belongs to *Pseudomonas fluorescens* biovar by physiological and biochemical identification and the 16S rDNA sequence analyzing.

**Key words** ACC, deaminase, bacteria identification

## 0 引言

为了寻找调理植物生长、调节植物体内乙烯生成的微生物资源和培育延长果蔬花卉保鲜期的植物新品种的功能性基因资源, 南京师范大学微生物工程重点实验室以 ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC) 为唯一碳源对植物根际具 ACC 脱氨酶活性的细菌进行了筛选, 筛选到菌株 XG32 的 ACC 脱氨酶活性最高, 对番茄幼苗促生效果明显<sup>[1]</sup>, 同时对辣椒疫霉等植物根际病原菌有一定的抑制作用.

本文采用生理生化试验、Biolog 法和 16S rDNA 序列同源性分析三种方法对菌株 XG32 进行了鉴定.

## 1 实验部分

### 1.1 供试材料

菌株: ACC 脱氨酶活性细菌 XG32 由本实验室分离于植物根际.

主要试剂: 96 孔 Biolog 板购自美国 Biolog 公司; FastDNA 试剂盒购自 Qiagen 公司; 琼脂糖购自

收稿日期: 2006-03-10 修回日期: 2006-05-08

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金 (03KJB180063) 资助项目.

作者简介: 刘维红 (1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物应用的学习与研究. E-mail: weihongliu81@163.com

通讯联系人: 闫淑珍 (1963-), 女, 副教授, 主要从事应用微生物的教学与研究. E-mail: yanshuzhen@njnu.edu.cn

Promega公司.

引物合成: 参考文献<sup>[2]</sup>, 设计引物 27f 5′ – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3′; 引物 1522r 5′ – AAGGAGGTGATCCAGCCGCA – 3′, 由上海博亚生物技术有限公司合成.

1.2 研究方法

1.2.1 菌株的培养形态和生理生化特征

按伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)<sup>[3]</sup>进行.

1.2.2 Biolog法鉴定

参照谢关琳<sup>[4]</sup>方法.

1.2.3 16SdNA 的扩增和测序

菌株在 LB培养基中 28℃振荡培养至对数期, 以 5 000 r/min离心收集菌体, 细菌基因组 DNA 分离纯化使用 FastDNA® 试剂盒. PCR反应体系: 10×buffer 5 μL, dNTPs( 2. 5 mmol/L) 4 μL, MgCl<sub>2</sub>( 15 mmol/L) 3 μL, 引物 27f(0. 5 μmol/L) 1 μL, 引物 1 522r( 0. 5 μmol/L) 1 μL, Taq DNA polymerase( 5 U /μL) 0. 5 μL, Template DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 致终体积 50 μL. PCR反应条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 30个循环, 12℃冷却恒定. 扩增后 16SdNA 纯化后由上海博亚生物技术有限公司直接测序.

1.2.4 系统发育学分析

从 GenBank中调取假单胞菌 12个菌株的 16SdNA 序列用于系统发育学分析, 所有菌株的 16SdNA 的全序列用 ClustalX( 1. 8)软件包排序, 选择大肠杆菌 (*Escherichia coli*)为外群, 用 MEGA version2软件包中的 Kimura2-Parameter Distance模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining法构建系统发育树, 1 000次随机取样, 计算自引导值 (Bootstrap)以评估系统发育树的置信度.

2 结果与讨论

2.1 ACC脱氨酶活性细菌 XG32培养形态和生理生化特征

菌株 XG32在 LB平板上 28℃培养 24 h, 菌落呈圆形光滑状, 湿润, 不透明, 边缘不整齐, 浅褐色, 易挑取, 在 LB液体培养基中呈混浊, 不形成菌膜. 表 1为菌株 XG32形态和理化特征, 与文献[ 3]对照, 该菌符合细菌 *P. fluorescens* biovar 特征.

表 1 ACC脱氨酶活性细菌 XG32的形态和生理生化特征

Table 1 Morphology, physiological and biochemical characteristics of ACC deaminase-containing rhizobacterium XG32							
形态或生理	菌株			生理生化	菌株		
生化特征	XG32	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. corrugata</i> *	特征	XG32	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. corrugata</i> *
形状	杆状	杆状	杆状	氧化酶	+	+	+
大小 (μm)	0. 6×2. 0	0. 7~ 0. 8×	0. 4×1. 1	接触酶	+	+	+
		2. 0~ 3. 0					
革兰氏染色	G-	G-	G-	绿脓菌素	-	-	
鞭毛	有, 极生	有, 极生	有, 极生	精氨酸双水解酶	+	+	
芽孢	-	-	-	从蔗糖产果聚糖	+	+	/-
41℃生长	-	-	-	H <sub>2</sub> S	-	-	
4℃生长	+	+/d	+	硝酸盐还原	+	+	
荧光可扩散色素	+	+	-	胞外 HIB水解	-	-	
无荧光可扩散色素	-	-	+	反硝化	+	+	/-
HIB积累	-	-	+	葡萄糖	+	+	
脂酶 ( Tween80)	+	- /d	-	D- 果糖	+	+	/d
淀粉水解	-	-	-	蔗糖	+	+	/-
明胶液化	+	+	+	间- 肌醇	+	+	

注: +, 反应呈阳性; -, 反应呈阴性; d, 11- 89% 菌株为阳性; \* *P. corrugata*的部分理化特性未在文献[ 3]中查到.

2.2 ACC脱氨酶活性细菌 XG32的 Biolog鉴定结果

24 h后, Biolog板各孔颜色变化已相当明显, 参照读数仪的机读结果, A1孔原始数据为 Cutoff值, 每孔的阴性阳性结果即可自动生成, 输入 Biolog配套计算机软件, 结果菌株 XG32与 *P. corrugata*最相近, SM (相似系数, Similarity)为 0. 632, 大于 0. 5

2.3 ACC脱氨酶活性细菌 XG32的 16SdNA 序列相似性比较与系统发育树

测得菌株 XG32的 16SdNA 基因组序列为 1 439 bp 此序列在 GenBank 中 BLAST 显示与假单胞菌属有较高的同源性,在构建的系统发育树中 (图 1),菌株 XG32与假单胞菌聚成一群,与 *P. fluorescens* 处于同一分支,序列同源性为 99.72%,菌株 XG32的登录号为 DQ431467.

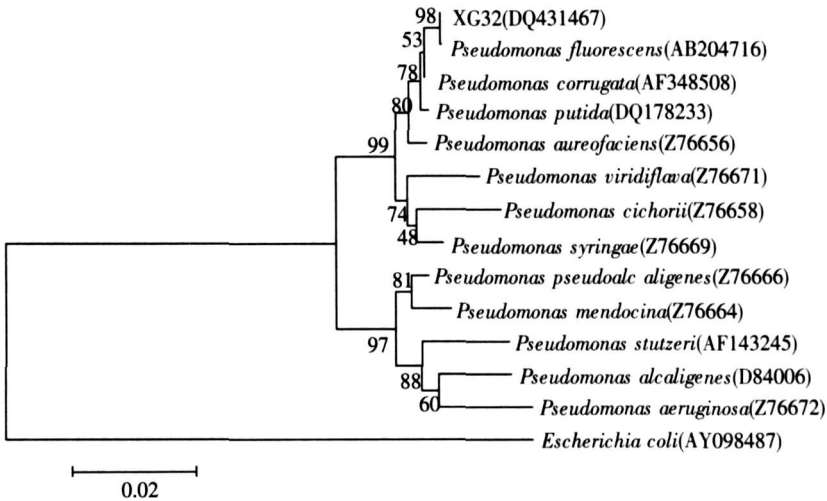


图1 16SrDNA 序列系统发育树  
Fig.1 Phylogenetic tree derived from the 16SrDNA suquences

2.4 分析与讨论

菌株 XG32鉴定结果集中到两个种,即荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)和波纹假单胞菌 (*P. corrugata*).由于 Biolog法以细菌纯培养物“代谢指纹”图谱为基础,与计算机的数值分类和聚类分析相结合,可简化工作量,但受原有模式菌株和数据库的限制和外界人为操作的影响较大,有时准确性不够<sup>[5]</sup>. 16SdNA 序列分析的系统发育学和表型特征存在较好的相关性<sup>[6]</sup>,越来越广泛地应用于细菌分类.本试验中 Biolog法的试验结果与生理生化 和 16SdNA 序列同源性分析结果有差异,认为可以排除 Biolog 法的结果,确定该菌株为 *P. fluorescens* bivar .

本研究表明单靠一种细菌鉴定方法有时难以将细菌鉴定到种,应该采用两种或多种方法结合鉴定细菌的结果比较可靠.从该菌株的鉴定工作中可认为,16SdNA 序列同源性分析和生理生化试验相结合是一种比较快速准确的方法.

[参考文献]

[1] 刘维红,闫淑珍,杨启银,等. ACC脱氨酶活性细菌筛选及其对番茄初生苗生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2006(2): 80-84

[2] Watanabe K, Kodana Y, Hamayana S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting[J]. Microbiol methods 2001; 44: 253-262

[3] Buchanan R E, Begey N E. Begey' s Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1994

[4] Xie G L. Characterization of *pseudomonas* spp. and other bacterial species associated with rice seeds[D]. Manila: IRI-IFLB, 1996: 166-174

[5] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干,等. BIOLLOG 系统鉴定黄瓜根围促生菌的初步研究[J]. 微生物学通报, 2000, 27(6): 403-407.

[6] Vandamme P, Pot B, Gillis M. Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematics[J]. Microbiol Rev 1996; 60: 407-438

[责任编辑: 孙德泉]