

## 海州香薷(*Elsholtzia splendens*)根际铜抗性细菌的筛选及生物多样性

孙乐妮, 何琳燕, 张艳峰, 张文辉, 王琪, 盛下放\*

(南京农业大学生命科学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要** 【目的】重金属耐性植物海州香薷根际铜抗性细菌的筛选及生物多样性研究将有助于了解微生物-超富集植物相互关系和植物修复机理、开发微生物-香薷重金属修复新技术。【方法】采用稀释平板涂布法从海州香薷根际筛选铜抗性菌株, 测定菌株溶磷和产生吡啶乙酸、铁载体、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶的特性, 采用16S rDNA限制性酶切多态性分析(amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)研究铜抗性细菌的遗传多样性, 根据16S rDNA相似性对产ACC脱氨酶的菌株进行了鉴定。【结果】分离纯化到27株抗 $\text{Cu}^{2+}$  20 mg/L的细菌, 所有菌株均能产生吡啶乙酸或其衍生物, 44.4%的分离菌株能够分泌高量的铁载体。分离菌株在60%相似性水平上可聚类分为7个群。5株细菌具ACC脱氨酶活性, 菌株2EBS12、2EBS13、2EBS15、3EBS11属于不动杆菌属(*Acinetobacter*), 菌株2EBS14属于产碱菌属(*Alcaligenes*)。【结论】海州香薷根际铜抗性细菌具有丰富多样的生物学特性和遗传多样性, 不动杆菌属和产碱杆菌属细菌具ACC脱氨酶活性。

**关键词**: 铜抗性细菌; 生物多样性; ACC脱氨酶; 海州香薷

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)10-1360-07

大量铜矿山的开采给生态环境带来了严重的问题, 矿区废弃地重金属污染的修复日益成为国内外研究的热点之一。矿区土壤中的铜绝大部分被土壤的各个组分吸附或结合, 其形态较为复杂, 以残留态、有机结合态和铁锰氧化物结合态为主, 而可交换态(包括水溶态)、碳酸盐结合态、铁锰氧化物结合态、有机结合态的铜均可作为或转化为生物有效态铜<sup>[1]</sup>。土壤中铜的生物有效性决定了铜的生物毒性。可交换态铜主要为 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Cu}(\text{OH})^+$ 两种形态, 是对生物产生污染毒害的最重要有效态, 同时也是影响重金属污染土壤修复效率的因素之一<sup>[2]</sup>。重金属污染土壤的植物修复技术因其成本低廉、环境友好而成为国际上关注的热点<sup>[3-5]</sup>, 但植物在重金属

等逆境条件下生长缓慢、生物量小, 严重影响了土壤修复的效率。微生物具有分布广泛、适应性强、容易变异等特点, 长期受重金属污染的环境中植物根际微生物对污染环境存在适应性分化。一些植物根际细菌通过产生1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶<sup>[6-8]</sup>、铁载体<sup>[8-9]</sup>、吡啶乙酸<sup>[9]</sup>以及溶解难溶性的磷酸盐<sup>[8]</sup>能够直接或间接地促进植物生长, 增大植物的生物量。因此利用抗性促生细菌提高植物修复效率的方法为生物修复创造了新途径, 已经成为该领域的研究重点<sup>[10-13]</sup>。

海州香薷(*Elsholtzia splendens*)是铜矿区分布最普遍的优势植物及指示植物<sup>[14]</sup>, 不仅能在土壤裸露、生境贫瘠的铜矿区及废弃地茂盛生长, 还能在水

基金项目: 国家自然科学基金项目(40371070, 40871127); 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA10Z404); "111"项目(B07030)

\* 通信作者。Tel: +86-25-84396484; Fax: +86-25-84396326; E-mail: xfsheng604@sohu.com

作者简介: 孙乐妮(1980-), 女, 山东文登人, 博士研究生, 主要从事污染环境微生物生态学研究。E-mail: sunleni@126.com

收稿日期: 2009-06-08; 修回日期: 2009-07-31

培条件下耐受1 mmol/L的高浓度  $\text{Cu}^{2+}$ <sup>[15]</sup>,从而为铜矿区生态重建和铜污染土壤修复提供了物种资源。目前采用海州香薷开展铜污染土壤植物修复机理和修复技术的研究,已从实验室水培、土培盆栽试验的生长反应特性、耐铜及解铜毒的酶学活性、代谢产物等一系列生理生化、细胞水平的反应进展到室外大田的修复研究<sup>[15-17]</sup>。为加快香薷属植物修复土壤铜污染的效率,研究者们采取了多种方法措施<sup>[18-19]</sup>。如添加化学强化剂乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二胺二琥珀酸(EDDS)等,生物强化剂菌根真菌等。但这些措施存在可能改变土壤原有的生态结构、造成二次污染、菌根真菌难于离体纯培养等缺陷。根际铜抗性细菌可能通过代谢产生小分子物质如有机酸、铁载体、氨基酸等增强植物对铜的耐受性,强化植物对铜的吸收。Chen等从海州香薷根际筛选到多株铜抗性细菌,并能活化土壤铜<sup>[20]</sup>,但是对植物根际细菌的其他生物学特性研究开展很少,从而限制了生态修复的应用。

本研究从铜矿废弃地采集海州香薷并分离根际铜抗性细菌,分析其16S rDNA限制性酶切多态性和生物学特性,筛选ACC脱氨酶产生菌,以期为进一步开发利用微生物资源、开展细菌强化海州香薷修复铜污染土壤的研究提供理论依据和试验材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源:于2008年10月采集生长于江苏南京汤山铜矿废弃地的海州香薷(*Elsholtzia splendens*)。将植物连根带土装入灭菌袋中,每种植物采三株,带回实验室,立即分离。

1.1.2 培养基:①细菌分离培养基:1/5 LB;②有氮培养基参照文献<sup>[8]</sup>配制;③SM培养基参照文献<sup>[6]</sup>配制并作适当改进,SMN培养基:在SM培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L, SMA培养基:在SM培养基中添加过滤除菌的ACC,使终浓度为3 mmol/L;④磷酸钙培养基<sup>[21]</sup>。以上培养基于 $1.034 \times 10^5$  Pa高压下,115℃灭菌15 min。

1.1.3 主要试剂和仪器:引物由上海英骏生物技术有限公司合成;Taq酶和限制性内切酶Hae III和Msp I购自TaKaRa公司;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O(分析纯)购自上海振欣试剂厂;ACC购自Sigma公司;PTC200 PCR仪购自Bio-Rad公司。

### 1.2 铜抗性菌株的分离筛选

轻轻抖动海州香薷根部,以去除根部周围松散的土壤,将根系紧密附着的2 mm左右的土壤取下作为根际土壤。称取根际土壤10 g,制备土壤悬液,稀释涂布于含Cu<sup>2+</sup>浓度为20 mg/L的1/5 LB平板,30℃恒温培养3 d后,随机挑取不同表型特征单菌落,在上述培养基上多次纯化后,转接于斜面,4℃保藏备用。

### 1.3 菌株的生物学特性

菌株对铜的抗性测定:将菌株用无菌牙签分别点接于含Cu<sup>2+</sup> 32 mg/L和64 mg/L的固体平板上,每一菌株设3个重复,28℃培养72 h,观察其能否生长及生长情况。菌株发酵液中吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)的测定参考文献<sup>[22]</sup>的Salkowski方法,铁载体(siderophore)测定参照文献<sup>[23]</sup>的相对定量检测法;菌株解磷活性采用磷酸钙固体培养基,培养72 h后,观察菌落周围有无透明圈,将有透明圈的菌株视为具有解磷活性。菌株ACC脱氨酶活性测定:采用SMN液体培养菌株,离心收集菌体,并用无菌水清洗两次后,制备成菌悬液,按1%接种量分别接入SM、SMA、SMN液体培养基,30℃培养3 d后,以600nm的吸光值判断菌株的生长状况, SMA上生长后的OD<sub>600/SMA</sub>明显高于SM培养基上的OD<sub>600/SM</sub>,视为具有ACC脱氨酶活性。对筛选出的具ACC脱氨酶活性的菌株革兰氏染色制片,并在光学显微镜下观察。

### 1.4 16S rDNA片段的限制性酶切多态性分析

分离菌株的基因组DNA提取参照文献<sup>[8]</sup>的方法,采用细菌通用引物27f:5'-AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG-3'和1492r:5'-TACGGCTACCTTGTTCAG-CCTT-3'扩增细菌16S rDNA。PCR反应条件为94℃预变性5 min,95℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸90 s,30个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物用经EB染色的0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物用Hae III和Msp I 2种限制性内切酶进行酶切。酶切体系为10 μL:0.5 μL限制性内切酶,1 μL 10×buffer,3 μL PCR产物,5.5 μL无菌超纯水。酶切反应混合物于37℃水浴3 h后,加1 μL 10×Loading buffer终止反应。酶切产物用3%琼脂糖凝胶电泳(100V,1 h)分离,EB染色,再用凝胶成像系统成像。所得DNA带型图谱在同一位置有带的记为“1”,没有的记为“0”。采用MVSP3.1聚类分析软件的平均连锁法(Unweighted Pair Group Mathematical Average,UPGMA)进行聚类分析并构建树状图谱。

## 1.5 具 ACC 脱氨酶活性的铜抗性菌株 16S rDNA 序列分析

将筛选到的具 ACC 脱氨酶活性的铜抗性菌株成功扩增的 PCR 产物直接由上海英骏生物技术有限公司完成 16S rDNA 的序列测定。将测定的序列用 BLAST 与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析,选取若干相似性较高的典型菌株 16S rDNA 序列,经 Clustal X1.83 进行自动排序比对后,用 MEGA 4.0 软件包中 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

## 2 结果和分析

### 2.1 铜抗性细菌的分离

采用含  $\text{Cu}^{2+}$  20 mg/L 的 1/5 LB 培养基,根据菌落大小、形态、颜色等特征,最终从海州香薷根际土壤中分离到 27 株铜抗性细菌,在筛选培养基上菌落为圆形、边缘整齐,多数菌落为白色或乳白色,少数为浅黄色。2EBS12、2EBS13、2EBS15 和 3EBS11 的菌落呈圆形、乳白色,表面光滑、湿润、隆起,边缘整齐;2EBS14 的菌落呈圆形、淡黄色,表面光滑、湿润、隆

起,边缘整齐。

### 2.2 菌株的生物学特性

由表 1 可看出,分离菌株中分别有 23 株和 11 株菌能在含  $\text{Cu}^{2+}$  32 mg/L 和 64 mg/L 的平板上生长,占分离菌株的 85.2% 和 40.7%。分离菌株均产生吲哚乙酸或其衍生物,其中 63% 能产生较多的吲哚乙酸。分离菌株中有 18 株菌(66.7%)能分泌铁载体(即  $A/Ar < 1$ , A 和 Ar 分别为接菌和未接种上清反应液在 630 nm 波长处的吸光值, A/Ar 比值越小表明产铁载体的量越多),其中 12 株菌株能够分泌较高量的铁载体(即  $A/Ar < 0.4$ ),占总分离菌株的 44.4%。分离菌株中有 10 株能够在磷酸钙平板上产生明显透明的溶磷圈,说明菌株具有溶磷能力。分离菌株中有 5 株细菌(2EBS12、2EBS13、2EBS14、2EBS15 和 3EBS11)能在 SMA 培养基生长良好,且  $\text{OD}_{600/\text{SMA}}$  显著高于  $\text{OD}_{600/\text{SM}}$ (对照),说明这 5 株细菌能以 ACC 为唯一氮源进行良好生长,具有 ACC 脱氨酶活性。菌株 2EBS12、2EBS13、2EBS14、2EBS15 和 3EBS11 菌体均为杆状,革兰氏阴性。

表 1 分离自海州香薷根际土壤的铜抗性菌株的生物学特性

Table 1 Characteristics of Cu-resistant bacterial strains isolated from rhizosphere soil of *Elsholtzia splendens*

Strain	Cu tolerance <sup>a</sup>	IAA <sup>b</sup>	Siderophore <sup>c</sup>	ACC deaminase activity	Phosphate-solubilizing
2EAS1	++	+++	—	—	—
2EBS2	++++	++	++++	—	—
2EBS3	++	++	—	—	—
2EBS5	++++	+	++++	—	+
2EBS8	++	+++	++++	—	—
2EBS9	++++	+++	++++	—	+
2EAS9	++++	+++	—	—	—
2EBS11	++++	+	++	—	+
2EBS12	++++	+	—	+	+
2EBS13	++	+	—	+	+
2EBS14	++	++	—	+	—
2EBS15	++	+++	—	+	+
2EBS17	++	+	++++	—	—
3EBS1	—	+++	++	—	—
3EAS2	++	++	++++	—	—
3EAS3	++++	+++	++++	—	—
3EAS4	++++	+++	++++	—	—
3EBS4	++	+++	—	—	—
3EBS5	++++	+++	++	—	+
3EBS6	—	++	+	—	—
3EAS7	++	+++	++++	—	—
3EBS71	—	+++	++++	—	+
3EBS72	—	+	++++	—	—
3EAS8	++	+	++++	—	—
3EAS88	++	+	+	—	—
3EBS8	++++	+	—	—	+
3EBS11	++++	+	+	+	+

a: ++, tolerant 32 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$ ; +++++, tolerant 64 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$ . b: IAA production: +++++, >20mg/L; ++, 10-20mg/L; +, <10 mg/L. c: +++++, 0.0-0.2; +++++, 0.2-0.4; +++++, 0.4-0.6; +++++, 0.6-0.8; +++++, 0.8-1; —, Negative

### 2.3 铜抗性菌株的 16S rDNA 限制性酶切多态性分析

本研究采用 *Hae* III 和 *Msp* I 两种限制性内切酶对扩增的 16S rDNA(约 1.5kb)进行了 ARDRA 分析。*Hae* III 酶切后分离菌株在 150 bp ~ 600 bp 之间产生 3 ~ 5 条带,且多数分离菌株在 340 bp 和 240 bp 处有一条共同的条带,分别占总分离菌株的 88.9% 和 63.0%,因此可以认定这两条带可作为海州香薷根际铜抗性细菌 *Hae* III 酶切的特征带;而用 *Msp* I 进行酶切后,分离菌株在 160 bp ~ 900 bp 之间会产

生 2 ~ 4 条带,多数分离菌株会产生 455 bp 和 800 bp 的两条带,分别占总分离菌株的 74.1% 和 55.6%,可以认定 455 bp 和 800 bp 为 *Msp* I 酶切的特征带。对这两种限制性内切酶酶切条带综合分析并构建 UPGMA 树状聚类图,所有分离菌株在 60% 相似性水平上可聚类为 7 个群(图 1)。77.8% 的菌株聚集在 G、B、D 三大群中,其中 G 群包含的菌株最多,占 51.6%;B 群次之,占 14.8%。C 和 F 两群分别仅包含一株菌。从分离菌株的酶切树状聚类图来看,分离菌株存在丰富的遗传多样性。

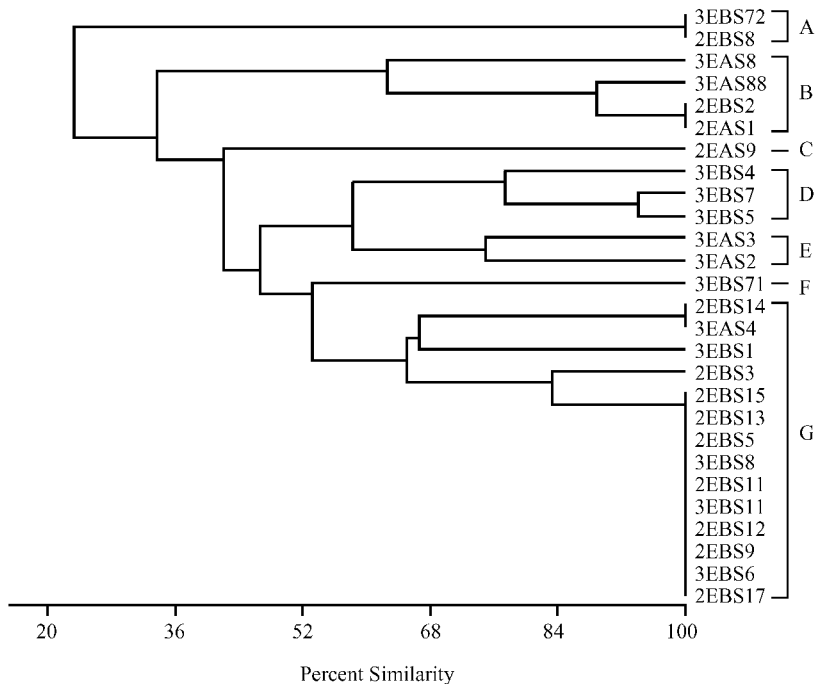


图 1 分离菌株基于 16S rDNA 的 *Hae* III 和 *Msp* I 酶切综合聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram of genetic divergences among strains based on the combined data for the *Hae* III- and *Msp* I-digested 16S rDNA.

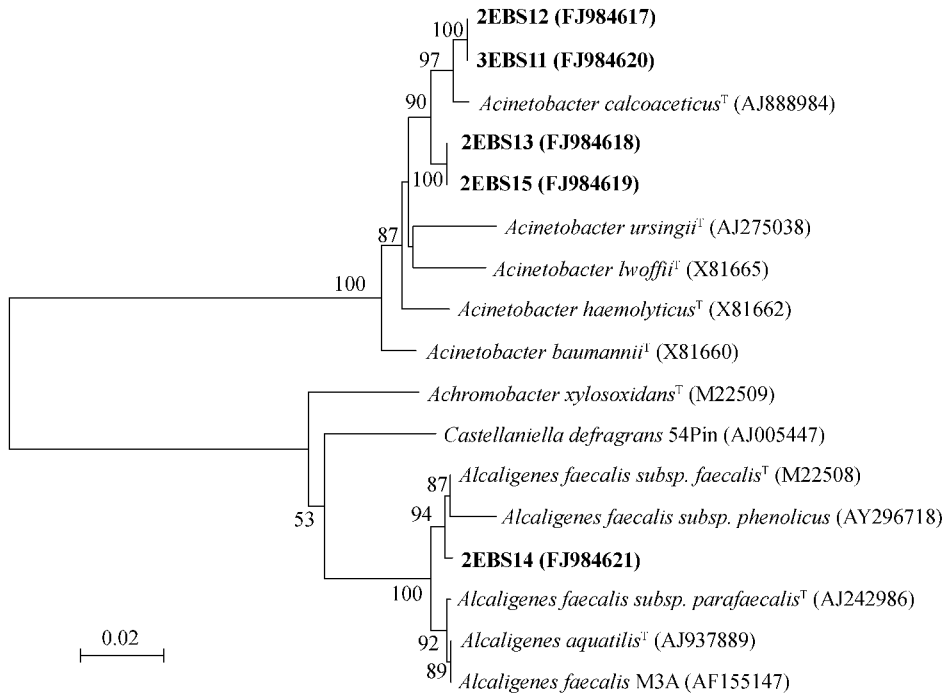
### 2.4 产生 ACC 脱氢酶的铜抗性细菌的系统发育关系分析

具 ACC 脱氢酶活性的细菌能够促进植物生长,增强植物的抗逆性。本研究对分离筛选到的 5 株产 ACC 脱氢酶的铜抗性菌株进行了 16S rDNA 序列分析,其 GenBank 登录号为 FJ984617-FJ984621。从 GenBank 数据库下载相似性较高的典型菌株序列,构建系统发育树(图 2)。菌株 2EBS12、2EBS13、2EBS15 和 3EBS11 的序列长度分别为 1456 bp、1456 bp、1455 bp 和 1453 bp,与醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 23055)相似性高达 98% 以上,即可认为这四株菌在系统发育关系上属于不动杆菌属(*Acinetobacter*),位于变形菌门(Proteobacteria), $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria),

假单胞菌目(Pseudomonadales),莫拉氏菌科(Moraxellaceae)。菌株 2EBS14 序列长度为 1413bp,与 *Alcaligenes faecalis* 的亚种 *subsp. faecalis*<sup>T</sup> 和 *subsp. phenolicus* 相似性分别达 98% 和 97%,并聚为一个分支,因此将菌株 2EBS14 鉴定为产碱菌属(*Alcaligenes*)的一个种。该分支在细菌系统分类上属于变形菌门(Proteobacteria), $\beta$ -变形菌纲(Betaproteobacteria),伯克霍尔德里氏菌目(Burkholderiales),产碱菌科(Alcaligenaceae)。

## 3 讨论

尽管严重的重金属造成废弃地内植被稀少,重金属胁迫对土壤微生物种群结构会产生一定程度的影响<sup>[11 24]</sup>,但根际以植物根系为中心聚集了大量的



2 具 ACC 脱氨酶活性的铜抗性菌株 16S rDNA 系统发育树

Fig.2 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among 16S rDNA sequences of Cu-resistant strains containing ACC deaminase activity and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resample data sets. Scale bar indicates evolutionary distance.

生命物质及其分泌物,构成了极为独特的“生态修复单元”<sup>[25]</sup>,重金属超积累或耐性植物与其根际细菌间的相互作用已备受关注<sup>[26-27]</sup>。海州香薷是中国铜矿区广泛分布的一种铜耐性富集植物和指示植物,在铜矿区生态重建和铜污染土壤修复方面有着广阔的应用前景。植物能够通过根系分泌物为细菌提供营养物质,促进抗性细菌在根际的大量生长繁殖,根际细菌能通过产生有机酸、铁载体等小分子物质螯合、活化重金属或其他营养元素,增强其可移动性和生物有效性,也可以通过多种方式促进植物生长、强化植物吸收重金属,从而对污染土壤起到修复作用。本研究从生长于铜矿废弃地的海州香薷根际分离筛选到 27 株铜抗性细菌,ARDRA 分析在 60% 的相似性水平上可分为 7 种遗传型,它们能够产生 IAA、铁载体、ACC 脱氨酶,溶解难溶性磷,具有较丰富的生物多样性。菌株的这些生物学功能可能对海州香薷的生长及根际铜的活化起到一定促进作用,同时从海州香薷根际分离铜抗性细菌,将有益于菌株在宿主植物根际的良好定殖,为成功发挥其生物学作用打下良好的基础。Belimov 等研究者还发现在长期受重金属污染的矿区废弃地上生长的重金属超积累或耐性植物如芥菜 (*Brassica juncea*)、贝托庭芥 (*Alyssum bertolonii*)、遏蓝菜属植物 (*Thlaspi*

*goesingense*)、油菜等根际和植株内部广泛分布重金属抗性细菌,且植物根际微生物的种群、功能、遗传特性等丰富多样<sup>[26-28]</sup>。关于超积累或耐性植物根际抗性细菌的生物多样性、在土壤-植物系统中对植物修复的影响与机制需要进一步深入研究。

在 ARDRA 分析中,分离菌株中 51.9% (14 株) 的菌株聚类于 G 群,5 株具有 ACC 脱氨酶活性的菌株 (2EBS12, 2EBS13, 2EBS15, 3EBS11, 2EBS14) 全部集中在 G 群,在系统发育关系上属于变形菌门 (Proteobacteria) 的 *Acinetobacter* 和 *Alcaligenes*,可见变形杆菌是海州香薷根际的优势菌群。Idris 等<sup>[25]</sup>从超积累植物 *Thlaspi goesingense* 根际分离到的细菌也多属于  $\alpha$ -变形杆菌门的 *Methylobacterium*、*Rhodococcus* 和 *Ohibacterium*,并能耐受高浓度的重金属。Mengoni 等<sup>[27]</sup>采用 T-RFLP 方法发现 Ni 超积累植物 *A. bertolonii* 根际土壤中细菌多样性比非根际土中更丰富,且变形杆菌居多。这种优势菌群的特征与超积累植物吸收重金属的关系还很不清楚,因此需要大力开发微生物培养技术,结合 DGGE、宏基因组等分子生物学方法,更好地提高微生物可培养性,挖掘和开发利用超积累植物根际微生物资源,进一步阐明超积累植物修复重金属污染的机理。

具 ACC 脱氨酶活性的细菌通过减少植物体内

乙烯的积累,可延缓植物的衰老、促进植物生长、增强植物的抗逆性,接种 ACC 脱氨酶活性的细菌对重金属污染的修复和治理起到了一定的效果<sup>[29]</sup>。目前已经报道的具 ACC 脱氨酶活性的细菌主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)<sup>[6,8,28]</sup>。本研究筛选到 5 株具 ACC 脱氨酶活性的铜抗性菌株,经 16S rDNA 序列分析表明它们中有 4 株菌属于不动杆菌属(*Acinetobacter*),这不仅丰富了产 ACC 脱氨酶新的菌种资源,也为 ACC 脱氨酶基因工程菌的构建和转基因操作提供了试验基础,对发展微生物-香薷属植物联合修复重金属污染土壤具有重要意义。

## 参考文献

- [ 1 ] 彭红云,杨肖娥. 香薷植物修复铜污染土壤的研究进展. 水土保持学报( *Journal of soil and water conservation* ), 2005, 19 : 195 - 199.
- [ 2 ] 王亚平,鲍征宇,侯书恩. 尾矿库周围土壤中重金属存在形态特征研究. 岩矿测试( *Rock and Mineral analysis* ), 2000, 19 : 7 - 13.
- [ 3 ] Raskin I, Smith RD, Salt DE. Phytoremediation of metals : using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8 : 221 - 226.
- [ 4 ] Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, et al. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants : Potential and challenges. *Plant Science*, 2009, 176 : 20 - 30.
- [ 5 ] 周启星,魏树和,刁春燕. 污染土壤生态修复基本原理及研究进展. 农业环境科学学报( *Journal of Agro-Environment Science* ), 2007, 26 ( 2 ) : 419 - 424.
- [ 6 ] Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard ( *Brassica juncea* L. Czern. ). *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37 : 241 - 250.
- [ 7 ] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. Metal tolerating methylophilic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato ( *Lycopersicon esculentum* L. ). *Chemosphere*, 2007, 69 : 220 - 228.
- [ 8 ] Jiang CY, Sheng XF, Qian M, et al. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 2008, 72 : 157 - 164.
- [ 9 ] Sheng XF, He LY, Wang QY, et al. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium - amended soil. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 155 : 17 - 22.
- [ 10 ] Khan AG. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005, 18 : 355 - 364.
- [ 11 ] Zhuang XL, Chen J, Shim H, et al. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*, 2007, 33 : 406 - 413.
- [ 12 ] He LY, Chen ZJ, Ren GD, et al. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72 : 1343 - 1348.
- [ 13 ] Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere*, 2009, 75 : 719 - 725.
- [ 14 ] 唐明灯,胡锋,吴龙华,等. 香薷属植物在重金属修复中的应用进展. 土壤( *Soils* ), 2008, 40 : 698 - 705.
- [ 15 ] Lou LQ, Shen ZG, Li XD. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 51 : 111 - 120.
- [ 16 ] Shi JY, Wu B, Yuan XF, et al. An X-ray absorption spectroscopy investigation of speciation and biotransformation of copper in *Elsholtzia splendens*. *Plant Soil*, 2008, 302 : 163 - 174.
- [ 17 ] Ni CY, Chen YX, Lin Q, et al. Subcellular localization of copper in tolerant and non-tolerant plant. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17 : 452 - 456.
- [ 18 ] 钱猛,沈振国,魏岚. 螯合剂 EDDS 和 EDTA 诱导海州香薷积累土壤重金属的比较研究. 农业环境科学( *Environmental Science* ), 2006, 25 ( 1 ) : 113 - 118.
- [ 19 ] Wang FY, Lin XG, Yin R, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth of *Elsholtzia splendens* and *Zea mays* and the activities of phosphatase and urease in a multi-metal-contaminated soil under unsterilized conditions. *Applied Soil Ecology*, 2006, 31 : 110 - 119.
- [ 20 ] Chen YX, Wang YP, Lin Q, et al. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. *Environment International*, 2005, 31 : 861 - 866.
- [ 21 ] 王岳坤,于飞,唐朝荣. 海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ), 2009, 49 ( 1 ) : 64 - 71.

- [ 22 ] Gordon SA , Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* , 1951 , 26 : 192 - 195 .
- [ 23 ] 赵翔,陈绍兴,谢志雄,等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)* , 2006 , 46 ( 5 ) : 691 - 695 .
- [ 24 ] 滕应,骆永明,李振高. 污染土壤的微生物多样性研究. *土壤学报(Acta Pedologica Sinica)* , 2006 , 43 ( 6 ) : 1018 - 1026 .
- [ 25 ] 魏树和,周启星,张凯松,等. 根际圈在污染土壤修复中的作用与机理分析. *应用生态学报(Chinese Journal of Applied Ecology)* , 2003 , 14 ( 1 ) : 143 - 147 .
- [ 26 ] Idris R , Trifonova R , Puschenreiter M , et al. Bacterial Communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2004 , 70 : 2667 - 2677 .
- [ 27 ] Mengoni A , Grassi E , Barzanti R , et al. Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology* , 2004 , 48 : 209 - 217 .
- [ 28 ] Sheng XF , Xia JJ , Jiang CY , et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape ( *Brassica napus* ) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* , 2008 , 156 : 1164 - 1170 .
- [ 29 ] Arshad M , Saleem M , Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology* , 2007 , 25 : 356 - 362 .

## Isolation and biodiversity of Copper-resistant bacteria from rhizosphere soil of *Elsholtzia splendens*

Leni Sun , Linyan He , Yanfeng Zhang , Wenhui Zhang , Qi Wang , Xiafang Sheng \*

( College of Life Science , Nanjing Agricultural University , Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment , Ministry of Agriculture , Nanjing 210095 , China )

**Abstract [ Objective ]** Isolation and characterization of rhizosphere copper-resistant bacteria from a copper accumulator plant *Elsholtzia splendens* were investigated. **[ Methods ]** Cultivable Cu-resistant bacteria were isolated by plating and screening from rhizosphere soils of *Elsholtzia splendens* growing on a copper mine tailing. Bacteria were characterized regarding characteristics that may be relevant for a beneficial plant-microbe interaction—Cu tolerance , phosphate-solubilizing , 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid ( ACC ) deaminase , siderophore and indoleacetic acid production , and further classified by restriction analysis of 16S rDNA ( ARDRA ). Strains that produced ACC deaminase were identified by 16S rDNA sequence analysis. **[ Results ]** Twenty-seven Cu-resistant strains were isolated from rhizosphere soil of *Elsholtzia splendens* and classified by ARDRA in 7 different taxonomic groups at the similarity level of 60% . All strains produced IAA or their derivatives , 44.4% of the strains produced a very high level of siderophores , and five strains were able to grow on ACC as the sole nitrogen source. Strains 2EBS12 , 2EBS13 , 2EBS15 and 3EBS11 were identified as *Acinetobacter* , strain 2EBS14 was essentially consistent *Alcaligenes* . **[ Conclusion ]** Cu-resistant rhizobacteria isolated from *Elsholtzia splendens* have abundant characteristics relative to promoting plant growth and genetic diversity , rhizobacteria *Acinetobacter* sp. and *Alcaligenes* sp. contained ACC deaminase activity.

**Keywords :** Rhizosphere Cu-resistant bacteria ; biodiversity ; ACC deaminase ; *Elsholtzia splendens*

( 本文责编 : 张晓丽 )