

两株抗铜细菌的筛选、鉴定及对碳酸铜的溶解作用^①

王桂萍, 郭明志, 陈亚华, 沈振国, 夏妍*

(南京农业大学生命科学院, 南京 210095)

摘要: 本研究从长期受铜污染的铜矿废弃地土壤中分离得到两株对重金属铜具有较强抗性的菌株 F16a 和 Fw17a。对菌株形态、生理生化特性及其 16S rDNA 系统进化进行分析, 将 F16a 鉴定为肠杆菌属(*Enterobacter*), Fw17a 鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。F16a 和 Fw17a 对氨基青霉素、头孢他啶均有抗性; 此外, Fw17a 还对氯霉素、四环素及低浓度的卡那霉素具有抗性。在有氮培养基(含 500 mg/L CuCO₃)液体培养 48 h 后, F16a 使培养基上清液中铜浓度增加了 300% 左右; 相反, Fw17a 使培养基上清液中铜浓度降低了 60% 左右。

关键词: 抗铜细菌; 生物学特性; 促溶作用

中图分类号: Q939

近几年来, 无论在中国还是在世界范围内, 矿区的开采和冶炼在带来经济效益的同时也带来了环境污染, 尤其是重金属污染。如何控制和减轻重金属对环境的污染和危害已成为一个日益突出的问题。植物修复技术因其成本低廉、环境友好和原位修复的优点而备受关注^[1]。但是, 用于污染土壤修复的植物通常生长缓慢、生长周期长且生物量低, 对生物有效性低的重金属不易吸收, 极大地影响了修复效率。因此, 研究者提出了多种强化植物修复的措施, 如添加植物激素等提高植物生物量^[2]; 通过添加化学螯合剂^[3-4]、活化重金属的微生物^[5]等提高重金属的生物有效性。大量研究表明, 植物体内、体表及根际存在大量对植物生长有促进作用的有益菌群, 它们在增强植株株高、干重、植株长势和抗性等方面均有明显的促进作用^[5]。微生物主要是通过其代谢作用及代谢产物, 促进土壤重金属的溶解, 提高重金属在土壤中的生物有效性, 促进植物根系对重金属的吸收^[6]。根际微生物从土壤和根系分泌物获得营养并通过代谢产物活化根际土壤重金属^[7-8]。另外, 微生物不仅可以活化土壤中的重金属, 而且也可以吸附与富集重金属, 从而减少重金属对水域环境危害的可能。Chen 等^[9]研究发现接种从海州香薷根际分离得到的细菌菌株可提高土壤中 Cu 的活性并提高海州香薷对 Cu 的积累。

虽然重金属 Cu 抗性菌株的筛选及 Cu 的细菌活

化作用等研究已有一些报道^[9-10], 但从长期受 Cu 污染的铜矿废弃地土壤中分离筛选 Cu 抗性菌株, 并同时成功获得溶解难溶性 Cu 和钝化可溶性 Cu 的细菌菌株还不多见。为此, 本研究开展 Cu 抗性菌株的分离筛选, 并对其生物学特性及对液体培养基中难溶性碳酸铜的溶解效果进行研究, 以期为提高植物-微生物联合修复 Cu 污染土壤提供理想的细菌材料。

1 材料与方法

1.1 土壤样品来源

土壤样品分别采自安徽铜陵凤凰山铜尾矿区(30°45'N, 117°42'E, 位于铜陵中东部, 该地区季风气候明显, 全年温和湿润)和南京市汤山镇九华山废弃铜尾矿(32°03'N, 118°47'E, 该地区属北亚热带湿润性气候, 属于低山丘陵地貌), 采用常规方法采集土壤样品, 样品保存于无菌自封袋中备用。

1.2 培养基与试剂

无机盐培养基(g/L): NaCl 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄·3H₂O 2.0 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, 去离子水 1 000 ml, pH 7.0。分离培养基: 在无机盐培养基中添加葡萄糖作为唯一碳源。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0 g, NaCl 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 去离子水 1 000 ml, pH 7.2。有氮培养基(g/L): 蔗糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g,

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD15B00)、江苏省科技支撑计划项目(BE2011781)和江苏省自然科学基金项目(BK2010064)资助。

* 通讯作者(yxia@njau.edu.cn)

作者简介: 王桂萍(1963—), 女, 湖北黄石人, 实验师, 主要从事植物营养生理及重金属污染土壤的生物修复研究。E-mail: gpwang@njau.edu.cn

NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, 去离子水 1 000 ml, pH 7.2。

庆大霉素、四环素、链霉素、卡那霉素、氨苄青霉素等抗生素购自上海捷倍思基因技术有限公司, 其他试剂均为分析纯。

PCR引物由上海英骏生物技术有限公司合成, DNA凝胶回收试剂盒购自上海捷倍思公司。

1.3 铜抗性菌株的分离、纯化

称土壤样品 2.0 g, 土样采用稀释平板涂布法^[11]和平板划线法进行菌株分离、纯化。将筛选所得到的菌株依次转接到 CuSO₄ 浓度分别为 20、30、50 和 100 mg/L 的分离培养基中, 每组设置 3 个重复。将分离得到的 Cu 抗性约为 100 mg/L 的菌株转接到分离培养基斜面中, 培养 24 h 后, 4℃ 保存, 用于后续试验。

1.4 铜抗性菌株的形态特征及生理生化分析

Cu 抗性菌株的鉴定参照东秀珠和蔡妙英^[12]与 Buchanan 和 Gibbons^[13]的方法进行。

1.5 菌株对抗生素敏感性试验

在 LB 液体培养基中分别添加如下抗生素: 庆大霉素、四环素、链霉素、卡那霉素、氨苄青霉素、氯霉素、红霉素和头孢他啶, 设置每种抗生素的浓度分别为: 10、100 mg/L 两个浓度梯度, 设置 3 个重复, 取对数期的供试菌株分别按 2% 的接种量接种在 LB 培养基中培养至对数期的菌株, 30℃, 200 r/min 摇床培养, 24 h 后观察。以不加抗生素的作为对照, 根据菌株是否能够生长来判断菌株对某种抗生素是否具有抗性。

1.6 抗铜菌株的分子鉴定

菌体总 DNA 的提取参考高盐法和 CTAB 法并做部分改进^[14-15]。以 F16a 和 Fw17a 的总 DNA 作模板, 利用 16S rDNA 的通用引物: 正向引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物 5'-TACCTTGT-TACGACTT-3'。将成功扩增的 16S rDNA 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (TianGen 公司), 纯化后连接 pMD19-T 载体 (TaKaRa 公司, 日本), 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 X-gal (40 μ g/mL)、IPTG (40 μ g/mL)、Amp (100 μ g/mL) 的 LB 平板上筛选并快速检测含有重组子的白色菌落。阳性克隆再经酶切鉴定后, 送南京金思特生物技术有限公司测序。测序结果登录 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与相关序列进行同源性比对。采用 Bioedit、Mega3.0 等软件进行系统进化分析, Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.7 铜抗性菌株对培养基中碳酸铜的活化

将供试细菌转接到含难溶性 CuCO₃ 的液体有氮

培养基 (500 mg/L CuCO₃) 中, 30℃, 振荡培养 60 h 后, 10 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中的 Cu 含量及溶液 pH。

2 结果与分析

2.1 铜抗性菌株分离筛选

采用稀释平板涂布法和平板划线法从采集于安徽铜陵、南京市汤山镇 Cu 污染土壤样品分离得到形态不同的细菌 48 株, 在将上述各菌株接种到含 Cu (CuSO₄) 固体培养基上生长。其中 40 株细菌能在含 CuSO₄ 为 100 mg/L 的固体培养基上良好生长, 对过量 Cu 有较强抗性。然后将以上 40 株菌株接入复筛培养基 (含 500 mg/L CuCO₃) 中, 对 CuCO₃ 具有促溶作用的菌株有 13 株, 对可溶性 Cu 具有钝化作用的菌株有 6 株。综合考虑, 分别选择活化 Cu 能力强的 F16a 和钝化 Cu 能力强的 Fw17a 作为后续试验的供试菌株, 二者均分离自安徽铜陵凤凰山土壤样品。

2.2 铜抗性菌株的形态及生理生化特征

菌株 F16a 和 Fw17a 的形态特征见表 1。同时由表 2 可知, 两株菌都属于好氧菌, 能还原亚硝酸盐和硝酸盐, 都能利用葡萄糖和蔗糖进行发酵, 但都不能利用乳糖; 苯丙氨酸脱氢酶呈阴性, 接触酶呈阳性。F16a 的 V.P. 和 M.R. 反应呈阳性, 而 Fw17a 呈阴性。明胶和淀粉水解试验中, F16a 呈阴性, Fw17a 呈阳性。两个菌株均不能产吡啶乙酸。

2.3 铜抗性菌株的抗生素敏感性试验

抗生素是某些微生物的次级代谢产物, 微生物通过产生抗生素来抑制其他微生物群体的生长和代谢活动, 因此获得更多的生存空间。抗生素敏感性试验结果如表 3 所示。在供试的 8 种抗生素中, 菌株 F16a 和 Fw17a 对氨苄青霉素、头孢他啶均有抗性, 对庆大霉素、红霉素和链霉素均敏感。Fw17a 对氯霉素、四环素及低浓度的卡那霉素也有抗性。

2.4 抗铜菌株的系统发育分析

以 F16a 和 Fw17a 的基因组 DNA 为模板, 利用 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 测序结果显示, 扩增所得的 F16a 16S rDNA 共 1 400 bp, Fw17a 16S rDNA 共 1 399 bp, 将它们 GenBank 注册, 其登录号分别为 GQ247734 和 GQ247733。将上述 2 个菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 上的其他 16S rDNA 序列进行 Blast 分析, 发现与 F16a 序列同源性最高的菌株绝大多数为肠杆菌, 与 Fw17a 序列同源性最高的菌株绝大多数为假单胞菌, 选取相关属种 16S rDNA 序列用 NJ 法构建系统发育树如图 1 和图 2。

表 1 菌株 F16a 和 Fw17a 菌体和菌落形态
Table 1 Colony and morphology characteristics of strains F16a and Fw17a

项目		菌株代号	
		F16a	Fw17a
菌落	形状	圆形	圆形
	颜色	乳白	乳白
	透明度	不透明	不透明
	表面	光滑、湿润、有光泽	表面隆起、湿润光滑
	边缘	整齐	略有突起
菌体	形状	短杆状	杆状
	长度(μm)	2.0~2.8	1.0~1.7
	宽度(μm)	0.6~1.0	0.5~0.9
	能否运动	无鞭毛,不能运动	有鞭毛,能运动
	是否产芽孢	产芽孢	不产芽孢
革兰氏染色		G ⁻	G ⁻

表 2 菌株 F16a 和 Fw17a 的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of Cu-resistant strains F16a and Fw17a

项目	F16a	Fw17a	项目	F16a	Fw17a
氧气	好氧	好氧	淀粉水解	-	+
亚硝酸盐还原	+	+	明胶水解	-	+
接触酶	+	+	葡萄糖发酵	+	+
乙酰甲基醇(V.P.)试验	+	-	乳糖发酵	-	-
甲基红(M.R.)试验	+	-	蔗糖发酵	+	+
硝酸盐还原	+	W	苯丙氨酸脱氨酶	-	-
吲哚乙酸	-	-			

注：“+”表结果阳性；“-”表结果阴性；“W”表结果微弱阳性，下同。

表 3 铜抗性菌株对不同抗生素的敏感性
Table 3 Antibiotic tolerance of Cu-resistant strains F16a and Fw17a

抗生素种类	F16a	Fw17a	抗生素种类	F16a	Fw17a
庆大霉素	-	-	卡那霉素	-	W
氨苄青霉素	+	+	红霉素	-	-
氯霉素	-	+	链霉素	-	-
头孢他啶	+	+	四环素	-	+

2.5 铜抗性菌株对碳酸铜的溶解作用

在含有难溶性 CuCO₃ 的有氮培养基培养条件下,铜抗性菌株 F16a 对 CuCO₃ 具有一定的活化效应(图 3B)。与对照处理相比, F16a 使培养基溶液中 Cu

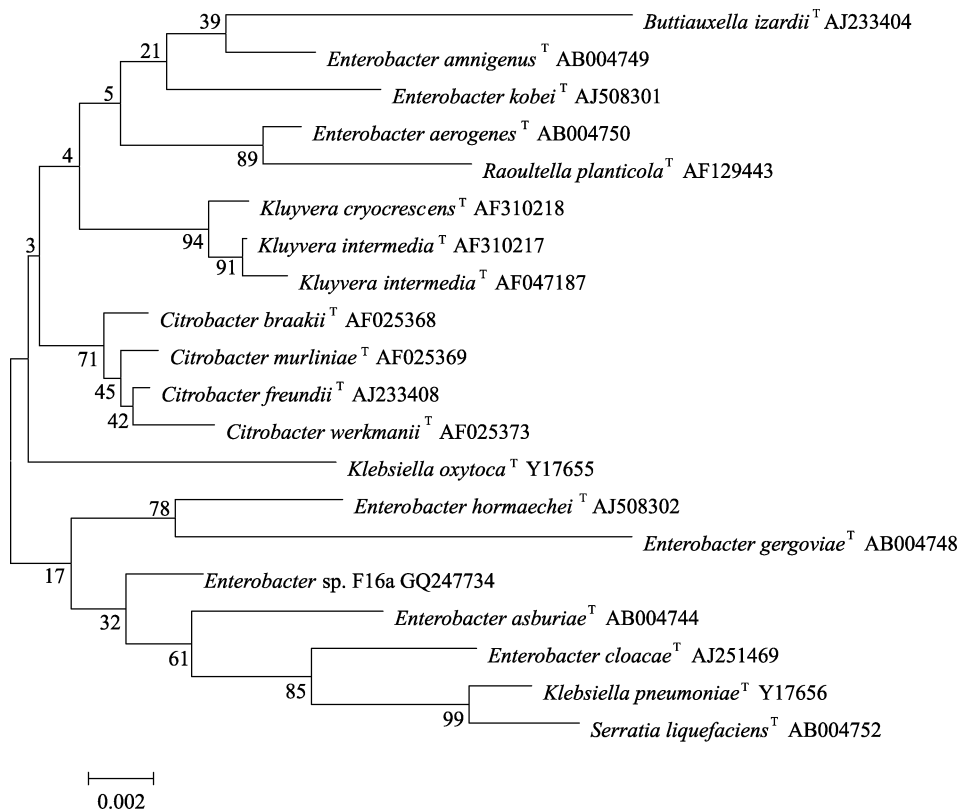


图 1 基于菌株 F16a 16S rDNA 序列的聚类分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences of Cu-resistant strain F16a and related species

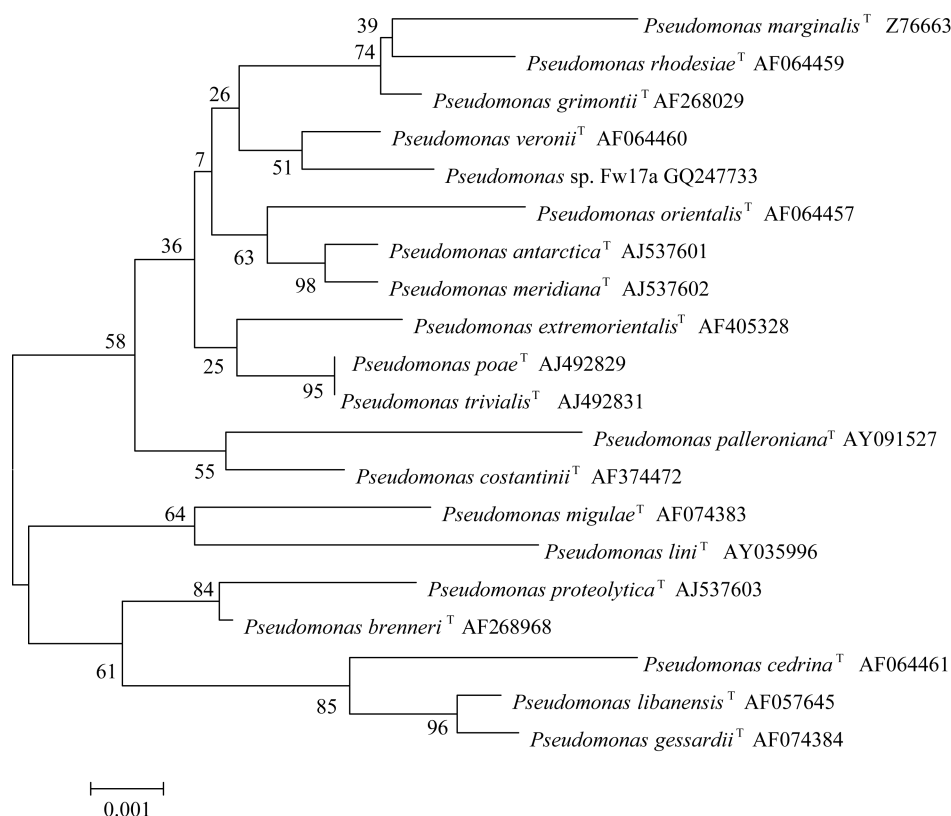
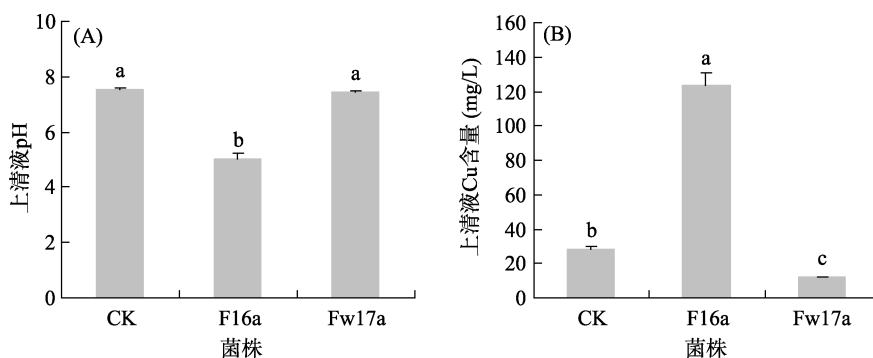


图 2 基于菌株 Fw17a 16S rDNA 序列的聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences of Cu-resistant strain Fw17a (B) and related species



(柱图上方不同小写字母表示不同菌株处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著)

图 3 液体培养条件下菌株 F16a 和 Fw17a 对上清液中 pH(A)及 Cu 含量(B)的影响

Fig. 3 Effects of F16a and Fw17a on pH value (A) and concentration of water-soluble copper in supernatant (B) of liquid culture containing 500 mg/L CuCO₃

浓度增加了 300% 左右。相反, Fw17a 降低了培养基溶液中的 Cu 浓度, 与对照处理相比降低了 60% 左右, 即 Fw17a 具有钝化 Cu 的作用。图 3A 显示菌株 F16a 降低了培养基溶液的 pH, 从对照处理的 7.48 降到了 5.07, 说明 F16a 的活化作用主要是由于产酸引起的。而菌株 Fw17a 与对照处理相比, 培养基溶液的 pH 没有明显的变化。

3 讨论

目前, 已有研究人员从伯克霍尔德氏菌属(*Burk-*

holderia)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等细菌中筛选到一些重金属抗性菌株^[16-20]。笔者从长期受 Cu 污染的土壤中分离出两株 Cu 抗性菌株 F16a 和 Fw17a, 根据形态观察、生理生化特征及 16S rRNA 同源序列比较, 分别属于肠杆菌属和假单胞菌属。Cu 在植物和藻类的新陈代谢中参与合成某些蛋白质和酶, 但过量的 Cu 会影响机体正常生理生化过程, 对细胞产生毒性。F16a 和 Fw17a 菌株可在 Cu 浓度为 500 mg/L 的培养基中生长, 也有其他报道与本文的结果相似:

Altimira 等^[21]筛选到 5 个 Cu 抗性菌株,这 5 个菌株 O12、A32、A55、C21 和 O4 抗 Cu 的半抑制浓度范围为 550~750 mg/L;Chen 等^[9]也从湖北铜绿山铜矿区生长的海州香薷根际土壤筛选到 12 株抗 Cu 细菌。根据上述结果可以初步推测,细菌对 Cu^{2+} 表现出的高抗性可能与筛选抗 Cu 细菌所取的土样有关:F16a 和 Fw17a 菌株均分离自安徽铜陵凤凰山 Cu 尾矿土壤,该尾砂矿库堆积时间已超过 30 年,5 个抗铜菌株 O12、A32、A55、C21 和 O4 均分离于 Cu 污染的农田土壤,该土壤 Cu 含量的范围为 379~784 mg/kg^[21];虽然重金属可以通过各种机制对微生物产生毒害作用,由于已经适应了上述高 Cu 的生存环境,故从受重金属污染土壤中分离得到的微生物可以表现出一定的金属抗性。

不同的菌株对环境中难溶性 Cu 的溶解作用可能存在不同的效应^[9],抗 Cu 菌株 M1~M12 分离于重金属污染土壤,除 M2 菌株外,其余 11 个菌株均可提高土壤中可溶性 Cu 含量^[9]。本文也得到了类似的结果,即菌株 F16a 对 CuCO_3 具有一定的活化效应,接种该菌株后,培养基上清液的可溶性 Cu 含量是对照处理的 4.4 倍。同时 F16a 降低了培养基溶液的 pH,从对照处理的 7.48 降到了 5.07,说明 F16a 的活化作用主要是由于产酸引起的。研究表明,土壤微生物通过产生的质子、有机酸、氨基酸等提高植物根际重金属的生物有效性^[6]。Cu 对细菌菌株有机酸的合成有明显的影响,Cu 能促进节杆菌属菌株 HQN2 产草酸、葡萄糖酸、酒石酸、苹果酸和乙酸,Cu 对微杆菌属菌株 JYC17 产草酸、葡萄糖酸、酒石酸、苹果酸、乙酸和丁二酸能力有促进作用,这 2 株 Cu 抗性菌株在生长过程中逐渐溶解了碱式 CuCO_3 ,菌株不仅能够耐受重金属 Cu 而且能够溶解难溶性的碱式 CuCO_3 ^[22]。根据表 2 和图 3 推测,菌株 F16a 也可能通过代谢产生的葡萄糖酸、苹果酸和乙酸等酸性物质来溶解难溶性 CuCO_3 ,提高培养基上清液中水溶性 Cu 含量。与菌株 F16a 的活化作用相反,接种 Fw17a 菌株后,培养基上清液可溶性 Cu 含量仅为对照处理的 40%;但对培养基上清液 pH 影响不大,Fw17a 可能是通过菌体本身对重金属进行吸附与富集,从而降低了培养基溶液中的 Cu 浓度。

近年来,植物根际-微生物系统的相互促进作用成为提高污染土壤生物修复能力的新的研究领域。细菌,作为土壤中数量最丰富、活动最旺盛的微生物,其作用不容忽视。细菌能产生植物激素、铁载体和酶类等代谢产物促进植物生长,提高植物富集重金属的

能力。Płociniczak 等^[23]从污染土壤中分离到的肠杆菌属菌株 MH8b 可通过分泌 ACC 脱氨酶、3-吲哚乙酸和氢氰酸促进无机磷的溶解提高植物生长,提高白芥对 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的吸收,Zhang 等^[20]也获得了类似的结果,筛选到的假单胞菌属菌株 Y1-3-9 具有较高的 ACC 脱氨酶活性和分泌 IAA 的能力,接种该菌株显著提高了油菜的生物量和地上部的 Cu 含量;江春玉^[10]筛选到的 1 株假单胞菌可有效提高土壤微生物对单一碳底物的利用能力,增加利用不同碳底物的微生物数量,有利于加速复合重金属污染的尾矿区生境的恢复。本文获得的 Cu 抗性菌株 F16a 和 Fw17a 均不能合成 IAA(表 2),但是否通过分泌 ACC 脱氨酶促进植物的生长、从而提高植物抗重金属能力还有待于进一步研究。

4 小结

本研究筛选得到 2 株生长势好、分别能够活化 Cu 和钝化 Cu 的抗性菌株 F16a 和 Fw17a。经生理生化和 16S rDNA 分子鉴定,它们分属于肠杆菌属 (*Enterobacter* sp. F16a)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp. Fw17a)。菌株 F16a 有明显的溶解难溶性 Cu 的能力,具有植物-微生物联合修复 Cu 污染土壤的潜力。

参考文献:

- [1] 陈怀满. 土壤中化学物质的行为与环境质量[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [2] Magidin M, Pittman JK, Hirschi KD, Bartel B. ILR2, a novel gene regulating IAA conjugate sensitivity and metal transport in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2003, 35: 523-534
- [3] Chen YH, Shen ZG, Li XD. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals[J]. *Applied Geochemistry*, 2004, 19: 1553-1565
- [4] Chen YH, Wang CC, Wang GP, Luo CL, Mao Y, Shen ZG, Li XD. Heating treatment schemes for enhancing chelant-assisted phytoextraction of heavy metals from contaminated soils[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27: 888-896
- [5] Sheng XF, Xia JJ. Improvement of rape (*Brassic napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria[J]. *Chemosphere*, 2006, 64: 1036-1042
- [6] Yang XE, Feng Y, He ZL, Stoffella PJ. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005, 18: 339-353
- [7] Miransari M. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29: 645-653

- [8] Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land: A review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2010, 8: 1–17
- [9] Chen YX, Wang YP, Lin Q, Luo YM. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*[J]. Environment International, 2005, 31: 861–866
- [10] 江春玉. 重金属铅镉抗性菌株的筛选、生物学特性及其强化植物修复铅镉污染土壤的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005
- [11] 沈萍, 范秀容. 微生物学实验[M]. 3版 北京: 高等教育出版社, 1999
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [13] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 8th ed. USA: The William & Wilkins Company, 1986
- [14] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(3): 1 215
- [15] 奥斯伯. 精编分子生物学指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 1999
- [16] 江春玉, 盛下放, 何琳燕, 马海艳, 孙乐妮, 张艳峰. 一株铅镉抗性菌株 WS34 的生物学特性及其对植物修复铅镉污染土壤的强化作用[J]. 环境科学学报, 2008, 28: 1 961–1 968
- [17] Poirier I, Hammann P, Kuhn L, Bertrand M. Strategies developed by the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* BA3SM1 to resist metals: A proteome analysis[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 128/129: 15–232
- [18] Pernezny K, Nagata R, Havranek N, Sanchez J. Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their usefulness for prediction of control with copper bactericides[J]. Crop Protection, 2008, 27: 256–262
- [19] 潘园园, 陈雯莉, 黄巧云. 一株抗重金属铜镉细菌的分离、鉴定及其 16S rDNA 的序列分析[J]. 微生物学通报, 2006, 32: 68–72
- [20] Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, Sheng XF. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*[J]. Chemosphere, 2011, 83:57–62
- [21] Altimira F, Yáñez C, Bravo G, González M, Rojas L A, Seeger M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 193
- [22] 马海艳, 张艳峰, 孙乐妮, 何琳燕, 盛下放. 铜耐性优势植物根际土壤铜抗性菌株的筛选及其对铜的促溶作用[J]. 土壤, 2009, 41(6): 886–891
- [23] Płociniczak T, Sinkkonen A, Romantschuk M, Piotrowska-Seget Z. Characterization of *Enterobacter intermedius* MH8b and its use for the enhancement of heavy metals uptake by *Sinapis alba* L[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 63: 1–7

Isolation and Biological Characterization of Two Copper-resistant Bacteria and Their Solubilization of Copper Carbonate

WANG Gui-ping, GUO Ming-zhi, CHEN Ya-hua, SHEN Zhen-guo, XIA Yan*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, Cu-resistant bacteria strains F16a and Fw17a were isolated from Cu-contaminated soil in copper mining wasteland, the strains F16a and Fw17a were identified preliminarily as *Enterobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., respectively, based on their morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences. The strains F16a and Fw17a exhibited the resistance to ampicillin and ceftazidime, and moreover, Fw17a was also resistant to chloramphenicol, tetracyclin and lower concentration kanamycin. F16a significantly increased the concentration of water-soluble copper in supernatant of liquid N-containing medium with 500 mg/L CuCO_3 , the concentration of water-soluble copper in supernatant was increased by 300% of water-soluble copper concentration in control. However, Fw17a decreased the concentration of water-soluble copper in supernatant by close to 60% compared with the control under the same conditions.

Key words: Cu-resistant bacteria, Biological characteristics, Solubilization