DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2017.01.012

具矿物风化效应伯克霍尔德氏菌的筛选与生物学特性研究①

毛欣欣，何琳燕，王 琪，盛下放*

(农业部农业环境微生物实验室，南京农业大学生命科学学院，南京 210095)

摘 要：从钾质粗面岩表面和野青茅根、根际和非根际土壤中分离筛选到 10 株具矿物风化效应的伯克霍尔德氏菌，通过菌株 16S rDNA 序列分析，10 株伯克霍尔德氏菌分别属于 6 个种群，同时研究了伯克霍尔德氏菌对钾长石和黑云母的溶解效应与菌株的生物学特性。结果表明，分离自不同生境伯克霍尔德氏菌对硅酸盐矿物的风化能力不同，供试伯克霍尔德氏菌从钾长石中释放出的 Si、K、Ca 分别比对照增加了 23.7% ~ 119%、12.6% ~ 40.3% 和 18.7% ~ 57.9%，从黑云母中释放出的 Si、K、Ca 分别比对照增加了 86.4% ~ 876%、5.6 ~ 14.6 倍和 70% ~ 147%；其中菌株 g6 从钾长石中释放 Si、K、Ca 的能力最强，菌株 G31 从黑云母中释放 K、Ca 的能力最强，而菌株 R22 从黑云母中释放 Si 的能力最强。在钾长石和黑云母存在条件下接种伯克霍尔德氏菌处理的发酵液 pH 分别为 3.05 ~ 4.67 和 7.03 ~ 7.43。不同伯克霍尔德氏菌产铁载体能力不同，而且对温度、pH 和盐浓度具有一定的耐受性。

关键词：伯克霍尔德氏菌株；硅酸盐矿物；矿物溶解；生物学特性

中图分类号：Q93; S1 文献标识码：A

硅酸盐矿物是土壤中矿质营养的重要来源[1]。矿物中的营养元素如 Si、K、Ca 等在矿物风化后成为有效态，可以为植物直接吸收利用。微生物–硅酸盐矿物相互作用是地球上广泛发生的一种地质作用，微生物作用下硅酸盐矿物的风化作用是表生环境中普遍存在的地球化学过程[2]。研究表明，细菌可以通过产生的有机酸、胞外多聚物以及铁载体等破坏矿物的晶格结构，释放出其中的营养元素[3–5]。细菌对于土壤矿物的溶解，对于岩石风化、元素生物地球化学循环、土壤形成以及土壤肥力的维持有重要的作用，同时在长时间尺度上对土壤环境和大气 CO_2 产生重要的影响[6–10]。

伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* spp.)广泛分布于各种生态环境中。虽然细菌分解硅酸盐矿物及其机制的研究已有不少报道[11–15]，但从钾质粗面岩表面和生长在矿区优势植物野青茅根、根际和非根际土壤中分离筛选高效风化硅酸盐矿物的伯克霍尔德氏菌并研究其对矿物溶解效能和生物学特性等至今未见报道。本研究采用高效选择性培养基，从钾质粗面岩表面和野青茅根、根际和非根际土壤中分离筛选高效矿物分解伯克霍尔德氏菌，并比较不同菌株溶解硅酸盐矿物的效能和生物学特性，丰富矿物风化细菌资源库，同时为提高土壤矿质营养提供理论依据和实验材料。

1 材料与方法

1.1 硅酸盐矿物和培养基

钾长石(购自烟台市华威矿业有限公司)元素组成：SiO_2 63.6%，K_2O 13.5%，Al_2O_3 18.4%，Fe_2O_3 1.7%，MgO 0.1%，CaO 0.04%；黑云母(购自河北华源云母厂)元素组成：SiO_2 39.9%，K_2O 9.1%，Al_2O_3 18.9%，Fe_2O_3 14.7%，MgO 13.6%，CaO 0.07%。矿物样品经粉碎、研磨和过筛，收集 100 ~ 300 目颗粒，用去离子水超声波清洗后，在 pH = 4 的盐酸溶液中浸泡 24 h，再用去离子水超声清洗若干次，直至溶液澄清并且 pH 达到 7.0，烘干备用。

BHm 培养基：150 mg $MgSO_4·7H_2O$，80 mg NaH_2PO_4，90 mg Na_2HPO_4，65 mg $(NH_4)_2SO_4$，20 mg $CaCl_2$，2 g 葡萄糖，1 L 蒸馏水，调节 pH 至 7.0；LB 培养基：10 g 胰蛋白胨，5 g 酵母粉，10 g 氯化钠，1 L 蒸馏水，调节 pH 至 7.0；有氮培养基：10 g 蔗糖，2 g K_2HPO_4，1 g $(NH_4)_2SO_4$，0.5 g $MgSO_4·7H_2O$，0.1 g NaCl, 0.5 g 酵母粉, 1 L 蒸馏水，调节 pH 至 7.0。

1.2 菌株分离与纯化

采用低钾选择性培养基(有氮培养基中的 K_2HPO_4 替换成等量的 Na_2HPO_4)按文献[16–17]分离。钾质粗

①基金项目：国家自然科学基金项目(41473075)资助。

* 通讯作者(xfsheng@njau.edu.cn)

作者简介：毛欣欣(1991—)，女，山东泰安人，硕士研究生，主要从事硅酸盐矿物–细菌相互作用研究。E-mail: 2013116068@njau.edu.cn

面岩和矿区优势植物野青茅样品采自南京小龙山钾矿区(118° 45′E，31°47′N)。采用稀释涂布法分离钾质粗面岩表面和野青茅根际和非根际土壤细菌；野青茅根内生细菌分离：灭菌剪刀取植株根部和地上部，自来水将根部清洗干净，无菌水再清洗一遍，75% 乙醇浸泡 3 min 后，无菌水冲洗一遍，2.5% 次氯酸钠浸泡 2 min，无菌去离子水冲洗 3 次。将表面消毒的根置于无菌研钵内研磨后取匀浆液涂布在低钾选择性培养基平板上，同时取最后一次浸洗的无菌水 100 μl 涂布于低钾选择性培养基平板上，以检测样品表面消毒是否彻底。从平板上随机挑取细菌单菌落，纯化后保存待用。

1.3 供试菌株对钾长石的溶解效应

贫营养 BHm 培养基作为矿物溶解试验培养基，以发酵液中有效 Al 含量的增加作为钾长石溶解的标志。150 ml 塑料瓶中分装 30 ml BHm 培养基，加入 0.15 g 钾长石粉，115℃灭菌 30 min，将供试菌株分别接种于 2 ml LB 培养基中培养 12～16 h，离心(6 000 r/min，5 min)收集菌体后，用无菌水洗涤 2 次后重悬于无菌水中，调整其 OD_{600} 为 0.8 左右，接种于每一只塑料瓶中，同时设不接菌处理为对照，28℃振荡(150 r/min)培养 7 天后分析发酵液中有效 Al 含量，以筛选高效溶解钾长石的细菌菌株。发酵液中有效 Al 含量的测定：将发酵液 10 000 r/min 离心 5 min，取上清液用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测定溶液中 Al 的含量。

1.4 矿物风化细菌的鉴定与伯克霍尔德氏菌株的筛选

将具有矿物风化能力的菌株用 LB 培养基活化，提取细菌基因组总 DNA 并以其为模板，采用细菌通用引物(27F/1492R)扩增其 16S rRNA 基因片段，扩增体系 25 μl：2×Taq mix(包含 5 U/μl DNA polymerase、DNA polymerase buffer 和 2.5 mmol/L dNTP)12 μl，10 mmol/L 引物各 0.5 μl，DNA 模板 1 μl，用水补足至 25 μl。扩增条件如下：94℃ 预变性 3 min；94℃变性 45 s，55℃退火 45 s，72℃延伸 90 s，30 个循环；72℃延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。将上述扩增得到的 16S rRNA 基因片段用 Axygen PCR 产物纯化试剂盒进行纯化，取纯化产物 2.5 μl 于 EP 管中，加入 0.3 μl *pEASY* T3 载体，用水补足至 5 μl，25℃ 连接 10 min，将连接产物全部加入 T1 感受态细胞中，冰浴 30 min，42℃水浴热击 30 s 后，迅速冰浴 2 min，加入 500 μl 液体 LB 培养基，37℃ 180 r/min 复苏 1 h。将复苏的感受态细胞悬液涂布于含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上，37℃ 培养 9～12 h，挑取克隆子用 M13 引物进行 PCR 验证，将阳性克隆子液体培养后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。将获得的序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 16S rRNA 基因序列进行比对分析，鉴定菌株。将获得的高效矿物风化伯克霍尔德氏菌用于菌株溶解矿物试验和菌株生物学特性测定。

1.5 摇瓶条件下伯克霍尔德氏菌对硅酸盐矿物的溶解效应

采用钾长石和黑云母作为供试硅酸盐矿物，矿物溶解试验同 1.3，振荡培养 7 d 后，用 Sartourius pB-10 型 pH 计测定发酵液中 pH。将发酵液 10 000 r/min 离心 5 min，取上清液用 ICP-OES 测定溶液中 Si、K、Ca 含量。

1.6 伯克霍尔德氏菌产铁载体能力测定

将供试菌株接入有氮液体培养基，在 30℃ 摇床中振荡培养 48 h，发酵液 6 000 r/min 离心 10 min，取 1.0 ml 上清液加入 1.0 ml CAS 检测液，混匀，以去离子水作对照，1 h 后测定 630 nm 波长处的吸光值；取 1.0 ml 未接菌的 1/5 LB 液体培养基与 1.0 ml CAS 检测液混匀，同法测定为参比值[18–20]。

1.7 温度、初始 pH 和盐浓度对伯克霍尔德氏菌生长的影响

将供试菌株点接于 BHm 固体平板，分别在 4℃、15℃、28℃、37℃和 45℃的温度下培养 72 h，观察其能否生长及生长情况；用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 将 BHm 培养基的 pH 调节至 2.0、4.0、7.0、8.5 和 10.0。将活化的供试菌株分别点接于上述不同 pH 的培养基中，28℃ 培养 72 h，观察其能否生长及生长情况；按质量百分比浓度分别配制 NaCl 浓度为 0.4%、0.8%、1.0% 和 2.0%的 BHm 培养基，将供试菌株分别点接于上述培养基上，30℃ 培养 72 h，观察其能否生长。

1.8 数据处理

所有试验数据均采用 Microsoft Office Excel 2007 处理，采用 SPSS 19.0 对数据进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 不同样品中矿物风化细菌的分离筛选

细菌广泛分布在岩石(矿物)表面、土壤和植物体内[4, 10]。以钾长石为唯一 K 源的选择性培养基分离到 38 株能够从钾长石中释放 Al 的细菌菌株，供试菌株从钾长石中释放的 Al 比不接菌对照增加 2.4～8.7 倍(图 1)。在这些矿物风化细菌中，16 株分离自岩石样

品表面，6 株分离自野青茅(*Deyeuxia arundinacea*)根部，6 株分离自根际土壤，10 株分离自非根际土壤。

2.2　具矿物风化效应伯克霍尔德氏菌株的鉴定及系统发育分析

通过对矿物风化细菌 16S rDNA 序列分析，共获得 10 株具矿物风化效应的伯克霍尔德氏菌，占矿物风化细菌的 26.3%(图 2)。其中，3 株(分别为 G21、G25 和 G31)分离自岩石表面，2 株(g4 和 g6)分离自野青茅根部，3 株(R22、R24 和 R28)分离自根际土壤，2 株(F1 和 F25)分离自非根际土壤。

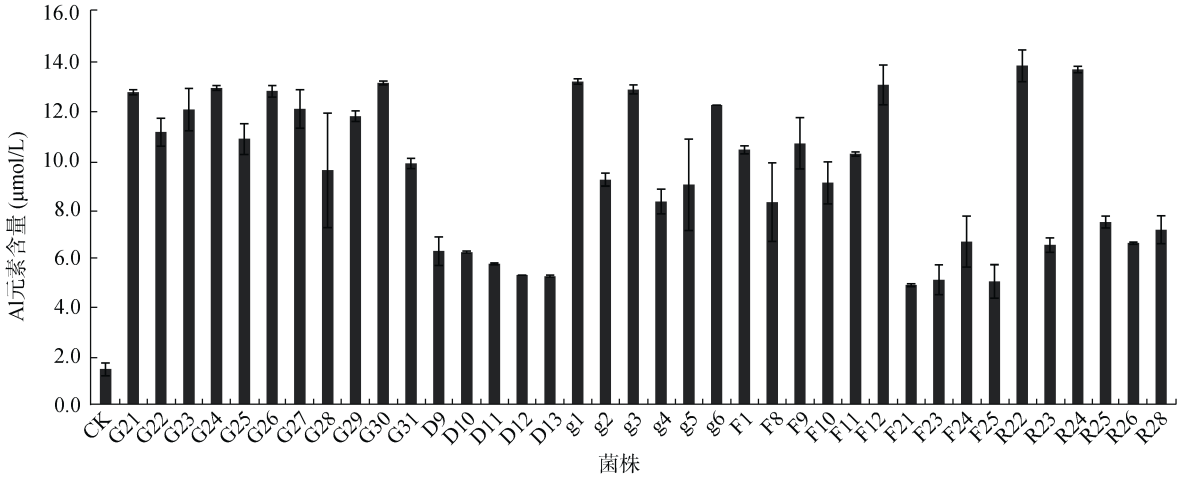

图 1　菌株对钾长石中 Al 元素的释放效应

Fig. 1　Al element release from potash feldspar in presence of bacteria

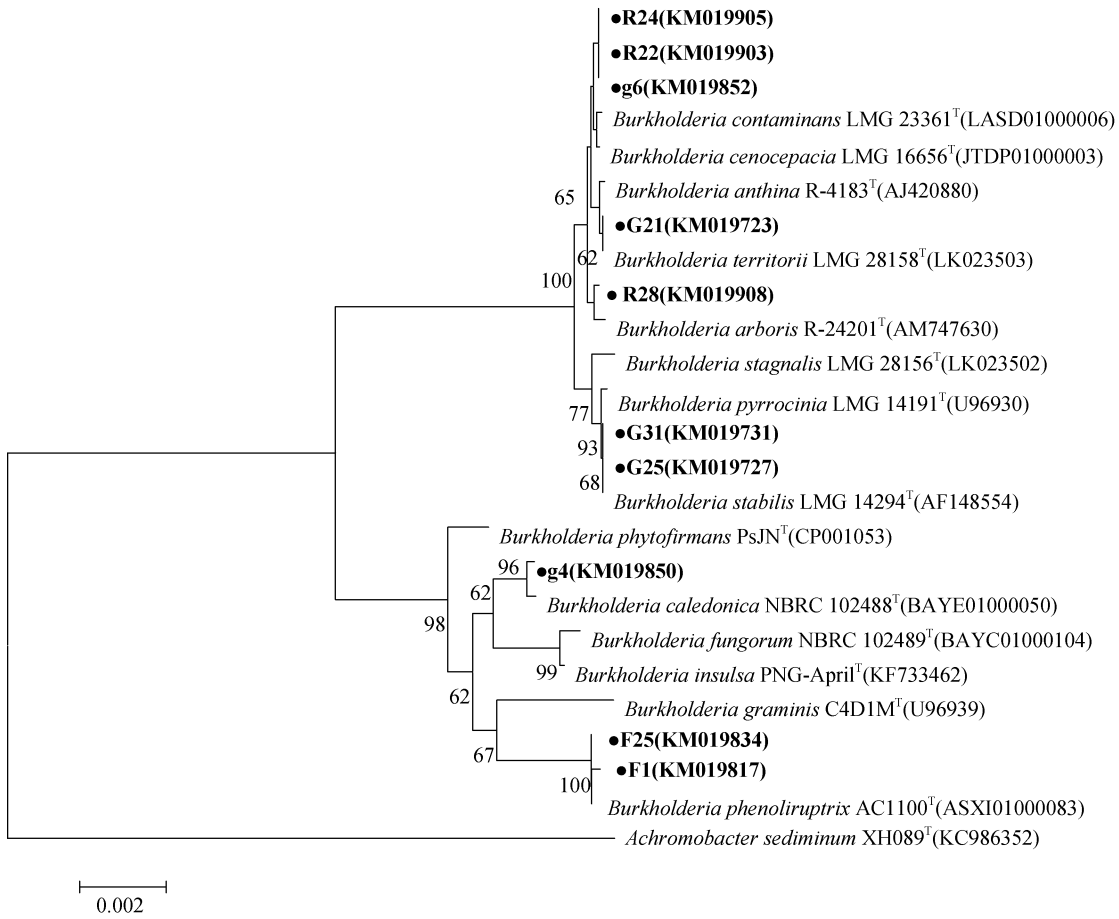

图 2　基于 16S rDNA 序列系统发育树(邻接法)

Fig. 2　Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences

将获得的具矿物风化效应的伯克霍尔德氏菌株 16S rRNA 序列在数据库中进行相似性比对，采用 MEGA 5.0 软件经邻接法构建系统发育树(图 2)，研究不同生境伯克霍尔德氏菌株的系统发育特征。由系统发育树可以看出，菌株 R24、R22、g6 形成一个分支，且与 *B. contaminans* LMG 23361 的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 99.86%、99.86% 和 99.93%；菌株 G31、G25 与 *B. stabilis* LMG 14294 形成一个分支，16S rRNA 基因序列相似性均为 100%；菌株 F25 和 F1 与 *B. phenoliruptrix* AC1100 形成一个分支，16S rRNA 基因序列相似性分别为 100% 和 99.93%；菌株 G21、R28 和 g4 分别与 *B. territorii* LMG 28158、*B. arboris* R-24201 和 *B. caledonica* NBRC 102488 形成一个分支，16S rRNA 基因序列相似性分别为 100%、99.86% 和 99.71%。由此可见，分离筛选到的具矿物风化能力的伯克霍尔德氏菌表现出一定的种群多样性(图 2)。

2.3 伯克霍尔德氏菌株对钾长石和黑云母的溶解作用

研究表明，细菌可以通过产生的有机酸、铁载体、多糖以及氧化还原作用加速矿物的风化并释放其中的元素[2, 4, 8, 13–14]。为了研究伯克霍尔德氏菌对不同硅酸盐矿物的风化能力，我们测定了伯克霍尔德氏菌对钾长石和黑云母中 Si、K、Ca 元素的释放能力以及发酵液中 pH 的差异(图 3)。结果表明，供试伯克霍尔德氏菌从钾长石中释放出的 Si、K、Ca 分别比对照增加了 23.7% ~ 119%、12.6% ~ 40.3%和 18.7% ~ 57.9%；其中菌株 g6 释放 Si、K、Ca 的能力最强，菌株 G31 释放 Si 的能力最弱，而菌株 G25、G31、R22、R24 和 R28 没有显著提高钾长石中 K 的释放能力；另外，供试伯克霍尔德氏菌在风化钾长石的过程中可以通过产酸来降低发酵液中的 pH，接菌处理的发酵液 pH 为 3.05 ~ 4.67，对照处理发酵液的 pH 为 6.58，其中菌株 R22 处理发酵液 pH 最低(图 3)。由图

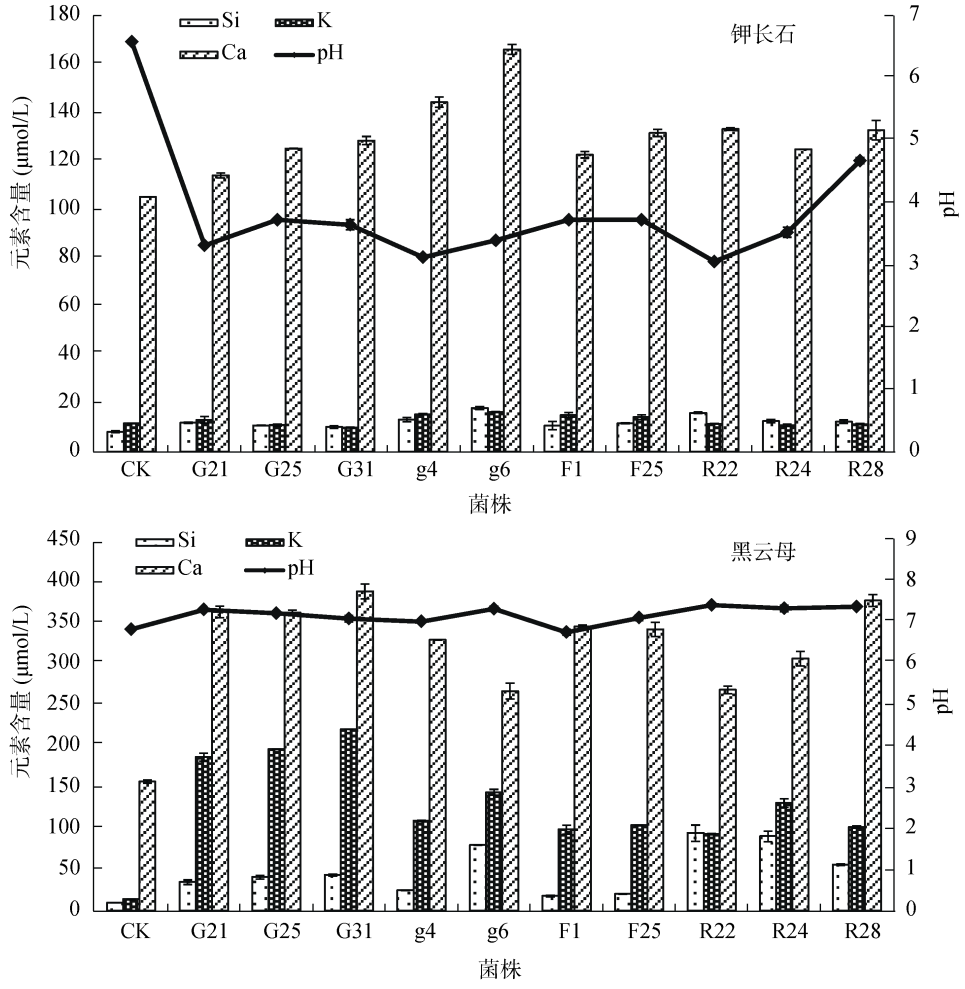

图 3 伯克霍尔德氏菌对风化钾长石和黑云母的溶解作用

Fig. 3 Element release from feldspar and biotite in presence of *Burkholderia* strains

3 可以看出，供试伯克霍尔德氏菌对黑云母的风化能力更强，接种伯克霍尔德氏菌处理的发酵液中 Si、K、Ca 的含量分别比对照提高了 86.4% ~ 876%、5.6 ~ 14.6 倍和 70% ~ 147%；其中菌株 R22 释放 Si 的能力最强，而菌株 F1 释放 Si 的能力最弱；菌株 G31 释放 K、Ca 的能力最强，而菌株 R22 释放 K 和菌株 g6 释放 Ca 的能力最弱。值得注意的是，在黑云母存在的条件下接菌处理发酵液的 pH 比对照(pH 6.84)偏高(菌株 F1 除外)，发酵液 pH 达 7.03 ~ 7.43，可能的原因是伯克霍尔德氏菌在风化黑云母过程中释放出大量的碱性元素(K、Ca)，使溶液 pH 升高(图 3)。另外，伯克霍尔德氏菌风化硅酸盐矿物的效能与矿物种类、菌株种类和来源密切相关(图 3)。

2.4　菌株产铁载体能力

铁载体是一类特异性螯合剂，是微生物在限铁条件下(即铁离子浓度较低时)产生并分泌的一种低分子量(<1 000 Da)、能够螯合 Fe (III)离子的化合物。本试验采用 CAS 通用检测法检测供试菌株产铁载体的能力。运用国际上通用的 A/Ar 比值(即菌株测定值/对照值)对微生物铁载体的产量进行半定量比较，A/Ar 比值越小菌株产铁载体能力越强[18–19]。菌株 G21 的 A/Ar 比值在 0 ~ 0.2 范围内，产铁载体能力最强；菌株 g4、g6、R22、R24 的 A/Ar 比值在 0.2 ~ 0.4 范围内，产铁载体能力较强；菌株 G25、G31 的 A/Ar 比值在 0.4 ~ 0.6 范围内，产铁载体能力中等；而菌株 F1、F25、R28 的 A/Ar 比值>1，不产铁载体。

2.5　菌株对环境的适应能力

伯克霍尔德氏菌对不同的温度、pH 和盐浓度等不同培养条件均表现出一定的适应性。供试伯克霍尔德氏菌为中温菌，在 15 ~ 37℃下能较好生长，最适生长温度为 30℃左右，菌株 F25 能够耐受高温，在 45℃下能够生长；供试伯克霍尔德氏菌生长的 pH 范围是 4 ~ 10，菌株耐酸耐碱，在 pH 4 和 pH 10 的条件下均能生长；供试伯克霍尔德氏菌均可在 0.4% ~ 1.0% 的 NaCl 中良好生长，菌株耐高渗能力较弱，只有菌株 F25 能够在 2% NaCl 中生长。

3　结论

1) 从岩石表面、野青茅根、根际和非根际土壤中分离筛选到具矿物风化能力的伯克霍尔德氏菌，系统发育学分析表明，具矿物风化能力的伯克霍尔德氏菌有较丰富的种群多样性。

2) 供试伯克霍尔德氏菌能够显著促进钾长石和黑云母的溶解并释放出其中的 Si、K、Ca 元素，菌株可以通过产酸加速硅酸盐矿物的风化。另外，伯克霍尔德氏菌风化硅酸盐矿物的能力与菌株的种类和来源有关，菌株 g6 和 G31 具有较好的应用前景。

3) 具矿物风化能力的伯克霍尔德氏菌具有较强的产铁载体的能力，不同的伯克霍尔德氏菌产铁载体的能力不同。

参考文献：

[1] Chardon E S, Livens F R, Vaughan D J. Reactions of feldspar surfaces with aqueous solutions[J]. Earth-Science Reviews, 2006, 78: 1–26

[2] Ehrlich H L. Geomicrobiology: its significance for geology[J]. Earth-Science Reviews, 1998, 45: 45–60

[3] Schulz S, Brankatschk R, Dümig A, et al. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation[J]. Biogeosciences, 2013, 10: 3983–3996

[4] Huang J, Sheng X F, Xi J, et al. Depth-related changes in community structure of culturable mineral weathering bacteria and in weathering patterns caused by them along two contrasting soil profiles[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80: 29–42

[5] Ahmed E, Holmström S J M. Microbe–mineral interactions: The impact of surface attachment on mineral weathering and element selectivity by microorganisms[J]. Chemical Geology, 2015, 403: 13–23

[6] Shirokova L S, Bénézeth P, Pokrovsky O S, et al. Effect of the heterotrophic bacterium *Pseudomonas reactans* on olivine dissolution kinetics and implications for CO_2 storage in basalts[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2012, 80: 30–50

[7] 彭云湘, 宋淼, Israel P, 等. 土生空团菌对白云母的风化作用及解钾特性[J].微生物学报, 2015, 55(3): 282–291

[8] 连宾. 矿物–微生物相互作用研究进展: 地质微生物专栏文章评述[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2014, 33(6): 759–763

[9] Uroz S, Turpault M P, Van S L, et al. Long term impact of mineral amendment on the distribution of the mineral weathering associated bacterial communities from the beech *Scleroderma citrinum* ectomycorrhizosphere[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43: 2275–2282

[10] Zhao F, Qiu G, Huang Z, et al. Characterization of *Rhizobium* sp. Q32 isolated from weathered rocks and its role in silicate mineral weathering[J]. Geomicrobiology Journal, 2013, 30: 616–622

[11] Balland C, Poszwa A, Leyval C, et al. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010, 74: 5478–5493

[12] Wang Q, Cheng C, He L Y, et al. Characterization of depth-related changes in bacterial communities involved in mineral weathering along a mineral-rich soil profile[J]. Geomicrobiology Journal, 2014, 31: 431–444

[13] Buss H L, Luttge A, Brantley S L. Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution[J]. Chemical Geology, 2007, 240: 326–342
[14] 张亮, 袁玲, 黄建国. 自生固氮菌对土壤钾的活化作用[J].土壤学报, 2015, 52(2): 399–405
[15] Wang R R, Wang Q, He L Y, et al. Isolation and the interaction between a mineral-weathering *Rhizobium* tropici Q34 and silicate minerals[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31: 747–753
[16] 中国科学院南京土壤研究所微生物实验室土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 51–57
[17] 何琳燕, 盛下放, 陆光祥, 等. 不同土壤中硅酸盐细菌生理生化特征及其解钾活性的研究[J]. 土壤, 2004, 36(4): 434–437
[18] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytic Biochemistry, 1987, 160: 47–56
[19] Manjanatha M G, Loynachan T E, Atherly A G. Tn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fredii* for siderophore overproduction[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1992, 24: 151–155
[20] 王璐, 何琳燕, 盛下放.耐铜苏丹草根内产 ACC 脱氨酶细菌的分离筛选及其生物学特性研究[J]. 土壤，2016, 48(1): 95–101

Isolation of Mineral-weathering *Burkholderia* Strains and Their Biological Characteristics

MAO Xinxin, HE Linyan, WANG Qi, SHENG Xiafang*

(*Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology*, *Ministry of Agriculture*, *College of Life Science*, *Nanjing Agricultural University*, *Nanjing* 210095, *China*)

Abstract: Ten mineral-weathering *Burkholderia* strains were obtained from the surface of potassic trachyte, root tissue interior, rhizosphere and bulk soils of *Deyeuxia arundinacea*. The *Burkholderia* strains belonged to six species based on 16S rDNA sequence analysis. In addition, the dissolution of feldspar and biotite by the strains and their biological characteristics were evaluated. The results showed that the *Burkholderia* strains isolated from different environments had different abilities to weather silicate minerals. The concentrations of Si, K and Ca were increased by 23.7%–119%, 12.6%–40.3% and 18.7%–57.9% released from feldspar and 86.4%–876%, 5.6–14.6 folds and 70%–147% released from biotite in the presence of the *Burkholderia* strains respectively compared with the controls. Among the strains, strain g6 had the best ability to release Si, K, and Ca from feldspar, strain G31 had the best ability to release K and Ca from biotite, while strain R22 had the best ability to release Si from biotite. pH in the culture medium inoculated with the *Burkholderia* strains ranged from 3.05–4.67 and 7.03–7.43 in the presence of feldspar and biotite, respectively. Furthermore, the *Burkholderia* strains had the different abilities to produce siderophores in culture medium. The *Burkholderia* strains also had the characteristics of acid or alkali and salt tolerances and temperature resistance.

Key words: *Burkholderia* strains; Silicate minerals; Dissolution of minerals; Biological characteristics