

水稻根系互作功能微生物的筛选方法

Screening Method of Functional Microorganisms Interacting with Rice Roots

赵金彤¹, 刘晓青¹, 韩东飞^{2*}, 伍宁丰¹, 田健^{1*}

¹ 中国农业科学院生物技术研究所; ² 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所

*通讯作者邮箱: tianjian@caas.cn; handongfei@caas.cn

摘要: 本文以稻田耐镉微生物的分离为例, 建立水稻互作功能微生物的分离方法。通过使用不同种类的培养基对镉污染农田和水稻中的微生物进行富集培养和镉胁迫筛选, 获得具有一定镉抗性的微生物。进一步评估抗镉菌株的耐镉能力和吸附镉能力, 鉴定筛选菌株的菌属类型, 确定安全菌株后进行水稻与微生物互作。通过琼脂管和蛭石盆进行水稻与耐镉和吸附镉的功能微生物互作实验, 测定水稻的生长指标和组织中的镉含量情况, 筛选获得具有促进水稻生长和降低水稻组织中镉含量的微生物。最终获得的具有降镉和促生作用的功能微生物可以用于生产实践中, 进行农田镉污染的治理并降低稻米中的镉含量。

关键词: 水稻, 重金属镉, 互作, 功能微生物

材料与试剂

1. 酵母提取物 (英国 OXOID 公司, OXOID, LP0021)
2. 蛋白胨 (英国 OXOID 公司, OXOID, LP0042)
3. NaCl (国药集团化学试剂北京有限公司, 国药化试, 10019318)
4. KCl (国药集团化学试剂北京有限公司, 国药化试, 10016308)
5. 无水乙醇 (天津市汇杭化工科技有限公司, 汇杭, 10009218)
6. 丙三醇 (国药集团化学试剂北京有限公司, 国药化试, 10010618)
7. NaClO (国药集团化学试剂北京有限公司, 沪试, 80010428)
8. $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (西陇化工股份有限公司, 西陇, A79)
9. 葡萄糖 (北京博奥拓达科技有限公司, Biotopped, G6150)
10. 琼脂粉 (北京索莱宝科技有限公司, Solarbio, A1890)

- 30 11. KH_2PO_4 (北京化工厂, 北化, A1049020)
- 31 12. $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (北京化工厂, 北化, A1049019)
- 32 13. Na_2HPO_4 (北京化工厂, 北化, A1060056)
- 33 14. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (北京化工厂, 北化, A1002012)
- 34 15. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (北京化工厂, 北化, A1037003)
- 35 16. NaOH (北京化工厂, 北化, A1060009)
- 36 17. Triton X-100 (Amresco 公司, Amresco, 0694-1L)
- 37 18. DNA 分子量标准 marker (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 鼎国, NMW012)
- 38 19. Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技股份有限公司,
- 39 诺唯赞, P505-d1)
- 40 20. 琼脂糖 (Biowest 公司, Biowest, 111860)
- 41 21. Gel Red 核酸凝胶染液 (Biotium 公司, Biotium, 41001)
- 42 22. LB 培养基 (见溶液配方)
- 43 23. 1/10 LB 培养基 (见溶液配方)
- 44 24. Burk 培养基 (见溶液配方)
- 45 25. PDA 培养基 (见溶液配方)
- 46 26. PBS 缓冲液 (见溶液配方)
- 47 27. 0.1 M CdCl_2 溶液 (见溶液配方)
- 48 28. 75%乙醇溶液 (见溶液配方)
- 49 29. 10%次氯酸钠溶液 (见溶液配方)
- 50 30. 40%甘油 (见溶液配方)
- 51 31. 0.1 M CdCl_2 溶液 (见溶液配方)
- 52 32. 0.9%生理盐水 (见溶液配方)
- 53 33. 裂解液 (见溶液配方)

54

55 仪器设备

- 56 1. 电脑三恒多用电泳仪电源 (北京六一仪器厂, 六一, DYY-10C)
- 57 2. 培清全自动凝胶成像分析仪 (上海培清科技技术有限公司, 培清, JS-680B)
- 58 3. 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司, Sartorius, BSA223S)

- 59 4. 立式压力蒸汽灭菌器 (江阴滨江医疗设备有限公司, 澄医, LS-35HD)
- 60 5. 超净工作台 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司, 亚泰科隆, YT-CJ-2D)
- 61 6. 智能生化培养箱 (北京博翔兴旺科技有限公司, 博翔兴旺, SPT-P58C)
- 62 7. 震荡培养箱 (上海旻泉仪器有限公司, 旻泉, MQT-60)
- 63 8. 水平振荡培养箱 (德国 Heidolph, Heidolph, D91126)
- 64 9. PCR 仪 (Bio-Rad 公司, Bio-Rad, 1852148)
- 65 10. 原子吸收分光光度计 (日本岛津公司, 岛津, AA-6880)
- 66 11. 多功能酶标仪 (Molecular Devices 公司, Molecular Devices, SpectraMax M2)
- 67 12. pH 计 (赛多利斯科学仪器有限公司, Sartorius, PB-10)
- 68 13. 三孔电热恒温水槽 (上海一恒科学仪器有限公司, 一恒, DK-8D)
- 69 14. 电磁炉 (奥克斯集团有限公司, AUX, CA2007G)
- 70 15. 微波炉 (美的集团股份有限公司, Midea, M1-L213C)

71

72 实验步骤

73 1. 功能微生物的筛选分离及纯化保存

74 1.1 土壤中功能微生物的筛选分离及纯化保存

75 1) 土壤中功能微生物的筛选分离

76 称取 3 g 镉污染地区的农田土壤, 将土壤样品放于已灭菌三角瓶中, 加入 50
77 mL 已灭菌的 0.9 %生理盐水, 用封口膜将三角瓶密封。将装有土壤的三角
78 瓶放于 30 °C 的震荡培养箱中, 在 200 rpm 下处理 30 min。将处理好的三
79 角瓶取出后静置 10 min, 吸取 1 mL 上清于已灭菌的离心管中制得土壤悬液
80 原液。使用 0.9%的生理盐水将土壤悬液原液分别稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、
81 10^{-4} 土壤悬液稀释液。各吸取 200 μ L 土壤悬液原液和稀释液分别涂布在含
82 有 0.5 mM 和 1 mM CdCl_2 的 1/10 LB 培养基 (LB 培养基、Burk 培养基、
83 PDA 培养基) 固体平板上, 吹干平板后放于 30 °C 生化培养箱中倒置培养 4
84 天, 观察菌落生长情况 (刘爱民, 2005; Siripornadulsil, 2013; 林晓燕等,
85 2015; Liu *et al.*, 2018) 。

86 2) 菌种纯化及存菌

对上述不同筛选平板进行观察，挑选菌落形态和颜色不同的单菌落，分别接种于液体 LB 培养基 (液体 PDA 培养基) 中，放于 30 °C 的震荡培养箱，在 200 rpm 下培养 24 h。将培养后的菌液划线培养纯化单菌落，以保证分离得到单一菌株。最后将纯化分离的单一菌株的活化菌液与 40 %甘油进行 1:1 混合，将菌液保存为 20%的甘油菌，冻存在-20 °C 冰箱备用。

1.2 水稻根系功能微生物的筛选分离及纯化保存

1) 水稻根际功能微生物的筛选分离及纯化保存

将水稻根系表面的土壤抖落，使用 10 mM PBS 缓冲液清洗水稻根系，清洗过程中将装有水稻样品的三角瓶放于 30 °C 震荡培养箱中，200 rpm 摇晃清洗 15 min。

取出清洗后的水稻根系，放于灭菌后的研钵中研磨，充分研磨后，将研磨液静置沉降 15 min。吸取研磨液上清，用 PBS 缓冲液进行稀释，制备成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的稀释液。各取 200 μ L 研磨液原液及稀释液分别涂布于无抗及含终浓度为 0.1 mM CdCl₂ 的 1/10 LB 培养基 (LB 培养基、Burk 培养基、PDA 培养基) 固体平板中，将平板倒置于 30 °C 的生化培养箱中，培养 1-2 天。

待平板长出菌落后，挑取菌落形态、颜色等不同的单菌落于含 0.1 mM CdCl₂ 的液体 LB 培养基 (液体 PDA 培养基) 中，在 30 °C 200 rpm 的震荡培养箱中培养 8-12 h，用 40%甘油和菌液进行 1:1 混合，将菌液保存为 20%的甘油菌，冻存于-20 °C 冰箱中。

2) 水稻根内微生物的筛选分离及纯化保存

将水稻根系清洗干净，称取 1-2 g 水稻根，用剪刀剪成小段于已灭菌的 150 mL 三角瓶中，加入 50 mL 75%乙醇浸洗 10 min，倒掉乙醇，用无菌水清洗 3 次，加入 50 mL 10%次氯酸钠浸洗 10 min，倒掉次氯酸钠，用无菌水清洗 5 次，取最后一次无菌水铺于无抗的 LB 培养基 (PDA 培养基) 中，以验证样品表面消毒干净 (胡桂萍，2010)。

将消毒清洗好的水稻根放入研钵，加入 10 mL PBS 缓冲液，充分研磨，取 100 μ L 研磨液，加入 900 μ L PBS 缓冲液充分混匀制成 10^{-1} 的稀释液，

以此类推，制成 10^{-2} 稀释液。各取 200 μL 原液及稀释液分别涂布于无抗及含终浓度为 0.1 mM CdCl_2 的 1/10 LB 培养基 (LB 培养基、Burk 培养基、PDA 培养基) 固体平板中，将平板倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 的生化培养箱中，培养 1-2 天。

待平板长出菌落后，挑取菌落形态、颜色等不同的单菌落于含 0.1 mM CdCl_2 的液体 LB 培养基 (液体 PDA 培养基) 中，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 的震荡培养箱中培养 8-12 h，用 40%甘油和菌液进行 1:1 混合，将菌液保存为 20% 的甘油菌，冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

2. 筛选菌株的镉抗性和镉吸附能力评估方法

2.1 筛选菌株的镉抗性能力评估方法

能够完全抑制菌株生长的培养基中重金属的最低浓度为该重金属的最小抑制浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)，可以用来反映细菌对重金属的抗性 (Andrews, 2001; Mitra *et al.*, 2018)。

将甘油管中保存的筛选菌株分别划线活化，然后挑取单菌落接种于 LB 培养基 (PDA 培养基) 中，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 的震荡培养箱中培养 8-12 h。

制备不同镉浓度梯度的 LB 培养基 (PDA 培养基)，设置 CdCl_2 浓度梯度为：0 mM、0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM、0.7 mM、0.8 mM、0.9 mM、1.0 mM。向 96 深孔板中的每一个样品孔中加入 800 μL 相应镉浓度的 LB 培养基 (PDA 培养基)。向每个孔中加入 10 μL 培养 12 h 的菌液，每个菌种三个平行，将深孔板盖子封紧后，放于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水平振荡培养箱中进行震荡培养。培养 24 h 后，用排枪吸取 200 μL 菌液到 96 孔酶标板中，使用酶标仪测定菌液在 600 nm 处的吸光值。以镉离子浓度为横坐标，OD600 为纵坐标，绘制菌株镉离子最小抑制浓度曲线，评估筛选菌株镉抗性能力 (李文华，2017；秦伟彤，2018)。

2.2 筛选菌株镉吸附能力评估方法

1) 样品制备

向试管中加入含 0.1 mM CdCl_2 的 LB 培养基 (PDA 培养基)，挑取筛选菌株进行活化培养，空白对照 (CK) 不接种，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养箱中 200 rpm 培养 24 h。吸取 1 mL 的菌液放入干净的离心管中，16,100 $\times g$ 离心 10 min，

吸取 500 μL 离心上清于 10 mL 离心管中，并向其中加入 4.5 mL 的 0.6 M HCl 进行稀释，涡旋震荡混匀，通过原子吸收分光光度计测定培养基上清中残余镉离子的浓度，同时测定空白对照 (CK) 的镉离子浓度 (李文华, 2017; Mitra *et al.*, 2018; Pramanik *et al.*, 2018; 余小霞, 2019)。

2) 标准曲线绘制

将 0.1 M CdCl_2 溶液稀释成终浓度为 0.1 mM CdCl_2 的标准液，按照表 1 中所示的体系操作，制备成不同浓度梯度的标准液，混匀后于原子吸收分光光度计测定，以镉离子浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线。每次测定样品时都要重新绘制标准曲线。

计算：镉吸附能力 = (空白对照镉离子浓度 - 样品上清液残余镉离子浓度) / 空白对照镉离子浓度 $\times 100\%$

表 1. 测定镉含量的标准曲线绘制

编号	1	2	3	4	5	6
0.1 mM CdCl_2 (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.6 M HCl (mL)	5	4.9	4.8	4.7	4.6	4.5
体系中 CdCl_2 的浓度 (μM)	0	2	4	6	8	10

3. 功能微生物的菌属鉴定

3.1 基于 16S rRNA 基因扩增子分析的功能微生物鉴定

16S rRNA 基因序列全长 1,542 bp, 包括 9 个可变区 (V1-V9) 和 10 个保守区，保守区序列反映了物种间的亲缘关系，而可变区序列则能体现物种间的差异。传统方法中最常用的引物是 27F 和 1492R，几乎能扩增出完整的 16S rRNA 基因全长，被广泛用于纯菌的分子鉴定。

将筛选获得的耐镉菌株在 LB 培养基上进行划线活化，挑取单菌落至 LB 液体培养基中，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 的震荡培养箱中培养 8-12 h，待细菌生长到对数期后，将菌液作为模板进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系如表 2 所示。采用细菌 16S rRNA 基因鉴定通用引物，正向引物 27F: 5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ， 反 向 引 物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (Pramanik *et al.*, 2017) 。

50 μ L 扩增体系如表 2:

表 2. 基于 16S rRNA 基因扩增子分析的功能微生物鉴定 PCR 扩增体系

菌液	1 μ L
27F (10 μ M)	2 μ L
1492R (10 μ M)	2 μ L
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ L
2x Phanta Max Buffera	25 μ L
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μ L
ddH ₂ O	18 μ L
总体积	50 μ L

PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

扩增时, 阴性对照使用 ddH₂O 作为模板, 以检测整个加样和 PCR 过程是否存在污染。阳性对照采用已知菌属类型的细菌如大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株作为模板, 检测 PCR 扩增的特异性。PCR 产物的纯化和测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。测序结果通过 BLAST 程序与 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中的已有菌株序列进行同源性比对, 通过分析 Identity 的数值大小 (Identity 大于 98%可确定其菌属相似性) 来分析菌株的菌属类别, 根据农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心公布的《菌种安全等级调整目录及依据》, 选择评定等级为 1 级 (免做毒理学试验) 的安全菌株进行水稻与微生物互作实验。

3.2 基于 18S rRNA 基因和内部转录间隔区 ITS 扩增子分析的功能微生物鉴定

在真核细胞中, 18S 核糖体小亚基 rRNA 基因进化速率比较保守, 在系统发育中较适用于种级以上阶元的分类; ITS 是内部转录间隔区, 属于中度保守的区域, 其保守性基本上表现为种内相对一致, 种间差异比较明显, 表现出极大的序列多态性, 被广泛用于生物种间系统发育和研究。

将筛选获得的耐镉菌株在 PDA 培养基上进行划线活化，挑取少量耐镉菌株的菌落，涂抹于 1.5 mL EP 管底部，盖上 EP 管盖子，放入微波炉中微波 2 min，取出冷却 30 s，并重复三次。向管中加入 45 μ L 裂解液后，放入沸水中煮 15 分钟，自然冷却后，16,100 $\times g$ 离心 5 min，取上清液作为模板进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系如表 3 所示。采用真菌 18S rRNA 基因鉴定引物和内部转录间隔区 ITS 引物进行扩增子分析的功能微生物鉴定。真菌 18S rRNA 基因鉴定引物，NS1: 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3', fung: 5'-ATTCCCCGTTACCCGTTG-3'。真菌内部转录间隔区 ITS 引物，ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS-5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (White *et al.*, 1999)。

50 μ L 扩增体系如表 3:

表 3. 基于 18S rRNA 基因扩增子分析的功能微生物鉴定 PCR 扩增体系

菌液	1 μ L
NS1 (ITS-4)	2 μ L
fung (ITS-5)	2 μ L
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ L
2 \times Phanta Max Buffera	25 μ L
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μ L
ddH ₂ O	18 μ L
总体积	50 μ L

PCR 扩增条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s，共 35 个循环，72 $^{\circ}$ C 10 min。

扩增时，阴性对照使用 ddH₂O 作为模板，以检测整个加样和 PCR 过程是否存在污染。阳性对照采用已知菌属类型的细菌如毕赤酵母 GS115 菌株作为模板，检测 PCR 扩增的特异性。PCR 产物的纯化和测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。测序结果通过 BLAST 程序与 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中的已有菌株序列进行同源性比对，通过分析 Identity 的数值大小 (Identity 大于 98 %可确定其菌属相似性) 来分析菌株的菌属类别，根据农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心公布的《菌种安全等级调整目录及依据》，选择评定等级为 1 级 (免做毒理学试验) 的安全菌株进行水稻与微生物互作实验。

4. 功能微生物提高水稻抗镉胁迫能力的应用

4.1 组培管实验

使用组培管进行水稻幼苗的培养，实验周期为 14 天左右，可以在较短时间内高通量地初步筛选与水稻根系互作后部分解除镉胁迫的菌株 (Jan *et al.*, 2019; 周鑫, 2020)。

1) 组培管培养基质的制备

在超净工作台中，向已灭菌的组培管（口径为 4 cm，管高为 15 cm）中倒入 70 mL 含 1/2 MS 营养液的 0.4%琼脂水溶液。自然冷却凝固，封好封口膜，备用。

2) 水稻种子的表面消毒

挑选大小一致，颗粒饱满的水稻籽粒，用无菌水清洗 3 次后，在无菌水中浸泡 3 h，让种子充分吸收水分。待种子浸泡后，加入 75%乙醇，浸洗 10 min，倒掉乙醇，用无菌水清洗 3 次，加入 10 %次氯酸钠溶液浸洗 10 min，倒掉次氯酸钠溶液后，再用无菌水清洗 5 次。

3) 菌液制备

提前将功能微生物的甘油菌划线活化，挑取单菌落于 3 mL LB 液体培养基 (PDA 液体培养基) 中，在 30 °C 200 rpm 的震荡培养箱中培养 8-12 h，按 1%的接种量转接于 50 mL LB 液体培养基 (PDA 液体培养基) 中，调节 OD600=1.0 (± 0.1) 左右 (约 10^8 CFU mL⁻¹)。

4) 菌液浸种

将表面消毒后的种子按照相同的数量分别加入到不同的菌液中，将装有菌液和种子的三角瓶放于 30 °C 200 rpm 的震荡培养箱中浸泡处理 1 h。

5) 种子移植

按每个处理组 7 粒种子移植到组培管中，其中 CK 组使用 LB 液体培养基 (PDA 液体培养基) 浸泡 1 h 的种子，实验组使用浸泡 1 h 菌液后的种子。每个处理组均设置 3 个平行。将移植后的组培管在 30 °C 的光照培养箱中培养 10 天。观察水稻幼苗的生长情况，测定水稻的根长和株高情况，评估筛选菌株高水稻抗镉胁迫能力的作用。

4.2 盆栽实验

为了进一步验证水稻根系互作功能微生物菌株的功能，选择使用周期更长的盆栽实验来进行实验 (Lin *et al.*, 2016; Punjee *et al.*, 2018; 赵金彤, 2019)。

1) 实验前的预处理

种子表消、菌液制备、浸种方法参照 4.1。

2) 蛭石盆制备

称取 140 g 蛭石于塑料方盆 (11.7 cm x 11.7 cm x 9.5 cm) 中，加入 350 mL 蒸馏水。备用。

3) 催芽实验

将浸种后的种子平铺于垫有滤纸的无菌培养皿中，并在培养皿中加入 5 mL 无菌水，在 37 °C 的生化培养箱中催芽 72 h。其中 CK、Cd 组用 LB 液体培养基 (PDA 液体培养基) 浸泡种子。

4) 水稻苗移植

将萌发后的种子，按每盆 9 粒种子移栽到提前准备的蛭石盆中，每个处理组设置 3 个平行。移栽好的蛭石盆放置在 28 °C，10/14 h (光/暗) 的温室里培养。待水稻幼苗生长到一叶一心时，实验组每盆添加 25 mL 过夜培养的菌液 (用等体积营养液重悬)，CK、Cd 组添加相同体积的营养液。在添加完菌液后的第二天，Cd 组和实验组加入 150 mL 终浓度为 0.05 mM 的 CdCl₂ 营养液，CK 组加入等体积的营养液。每隔三天浇 100 mL 营养液，培养周期为 1 个月。

5) 水稻幼苗生长情况测定

水稻幼苗生长至四叶一心时，收取水稻幼苗，并进行生长参数的测定。观察不同处理组的水稻生长情况，拍照记录，对比不同处理组的表型差异。将水稻幼苗从蛭石培养基质中小心地拨出，以减少对水稻根部和叶片的破坏。测定每盆水稻的根和茎的长度。测量后，将水稻幼苗根部的蛭石清洗干净，分离水稻地上部分的茎叶和水稻地下部分的根系，用牛皮纸袋分别收集茎叶和根系。将装有水稻根和茎的牛皮纸袋放于烘箱干燥 (65 °C) 直至达到恒重，用分析天平称量干重，记录每盆水稻地上部分茎叶和地下部分根系的重量 (Treesubsuntorn *et al.*, 2018)。

6) 水稻样品中重金属的测定

a. 试样制备

将烘干后的茎叶和根系磨碎，过 1 mm 筛子后混合均匀，将磨碎样品装入密闭广口试样瓶，低温保存，备用。

b. 试样处理

准确称取 5-10 g 试样于 100 mL 硬质烧杯中，置于马福炉内，微开炉门，由低温开始，先升至 200 °C 保持 1 h，再升至 300 °C 保持 1 h，最后升温至 500 °C 灼烧 16 h，直至试样成白色或灰白色，无碳粒为止。将处理后的样品取出冷却，加水润湿，加 10 mL 硝酸，在电热板或砂浴上加热分解试样至近干，冷却后加入 10 mL 1 M 盐酸溶液，将盐类加热溶解，内容物移入 50 mL 容量瓶中，再以 1 M 盐酸溶液反复洗涤烧杯，洗液并入容量瓶中，以 1 M 盐酸溶液稀释至刻度，摇匀备用 (黄秀清, 2007)。

c. 标准曲线绘制

精确分取镉标准工作液 0 mL、1.25 mL、2.50 mL、5.00 mL、7.50 mL、10.00 mL，分别置于 25 mL 具塞比色管中，以 1 M 盐酸溶液稀释至 15 mL，依次加入 2 mL 碘化钾溶液，摇匀，加 1 mL 抗坏血酸溶液，摇匀，准确加入 5 mL 甲基异丁酮，振动萃取 3-5 min，静置分层后，有机相导入原子吸收分光光度计，在波长 228.8 nm 处测量样品的吸光度，以吸光度为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线 (郭爽, 2004)。

d. 试样测定

准确分取 15-20 mL 待测试样溶液及同量试剂空白溶液 25 mL 具塞比色管中，依次加入 2 mL 碘化钾溶液，其余同标准曲线绘制测定步骤。

溶液配方

1. LB 培养基

蛋白胨 10 g L⁻¹，酵母粉 5 g L⁻¹，氯化钠 10 g L⁻¹，将 pH 调至 7.0 (固体培养基含 1.5% 琼脂粉)，121 °C 高压灭菌 20 min，备用

2. 1/10 LB 培养基

蛋白胨 1 g L⁻¹，酵母粉 0.5 g L⁻¹，氯化钠 10 g L⁻¹，葡萄糖 5 g L⁻¹，将 pH 调至 7.0 (固体培养基含 1.5 % 琼脂粉)，121 °C 高压灭菌 20 min，备用

301 3. Burk 培养基

302 KH_2PO_4 0.8 g L⁻¹, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.262 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2
303 g L⁻¹, 酵母粉 1 g L⁻¹, 固体培养基加入 1.5 %琼脂粉, 121 °C 高压灭菌 20 min, 备
304 用

305 4. PDA 培养基

306 称取 200 g 马铃薯, 洗净去皮切成小块, 加水煮烂 (煮沸 20-30 min, 能被玻璃棒戳
307 破即可), 用八层纱布过滤, 弃去滤渣, 向滤液中加入 20 g 葡萄糖和 15 g 琼脂, 加
308 入蒸馏水定容至 1 L, 将 pH 调至 7.4, 121 °C 高压灭菌 20 min, 备用

309 5. PBS 缓冲液

310 KH_2PO_4 0.2 g L⁻¹, Na_2HPO_4 1.15 g L⁻¹, 氯化钠 8 g L⁻¹, 氯化钾 0.2 g L⁻¹, 将 pH 调
311 至 7.4, 121 °C 高压灭菌 20 min, 备用

312 6. 0.1 M CdCl_2 溶液

313 称取 4.567 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 溶于去离子水, 定容至 200 mL, 121 °C 高压灭菌 20
314 min, 备用

315 7. 75%乙醇溶液

316 量取 375 mL 无水乙醇, 用去离子水定容至 500 mL。备用

317 8. 10%次氯酸钠溶液

318 量取 50 mL 次氯酸钠溶液, 用去离子水定容至 500 mL。备用

319 9. 40%甘油

320 量取 40 mL 甘油, 用去离子水定容至 100 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min, 备用

321 10. 0.1 M CdCl_2 溶液

322 称取 4.567 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2 \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 溶于去离子水, 定容至 200 mL, 121 °C 高压灭菌 15
323 min, 备用

324 11. 0.9%生理盐水

325 称取 9 g NaCl 溶于蒸馏水, 定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用

326 12. 裂解液

327 20 mM NaOH, 2.5% Triton X-100

328
329 致谢

1. 本实验得到国家自然科学基金项目 (31770124) 的资助。
2. 已发表的使用过本实验方案的文章: Yu, X., Ding, Z., Ji, Y., Zhao, J., Liu, X., Tian, J., Wu, N. and Fan, Y. (2020). [An operon consisting of a P-type ATPase gene and a transcriptional regulator gene responsible for cadmium resistances in *Bacillus vietnamensis* 151-6 and *Bacillus marisflavi* 151-25 \(researchgate.net\)](#) .*BMC Microbiol.* 20, 18.
3. 感谢中国农业科学院生物技术研究所余小霞、秦伟彤、周鑫在本方法构建及改进过程中的工作。

参考文献

1. 郭爽. (2004). [饲料中测铅方法的改进与铅、镉连续测定的应用](#). *饲料工业*.(01): 53-54.
2. 胡桂萍. (2010). [水稻内生菌及其根系土壤微生物群落多样性的研究](#). 福建农林大学.
3. 黄秀清. (2007). [石墨炉原子吸收法测定饲料中镉含量](#). *中国饲料*.(14): 34-35.
4. 李文华. (2017). [卡伍尔链霉菌 TJ430 和荧光假单胞菌 P32 的镉吸附机理及对水稻镉积累特性影响](#). 中国农业科学院.
5. 林晓燕, 牟仁祥, 曹赵云, 朱智伟, 陈铭学. (2015). [耐镉细菌菌株的分离及其吸附镉机理研究](#). *农业环境科学学报*. 34(09): 1700-1706.
6. 刘爱民. (2005). [耐镉细菌筛选与吸附镉机理研究及其在镉污染土壤修复中的应用](#). 南京农业大学.
7. 秦伟彤. (2018). [大肠杆菌镉抗性相关基因的挖掘及功能验证](#). 中国农业科学院.
8. 余小霞. (2019). 抗镉细菌的筛选及其抗镉和吸附镉的机制解析. 中国农业科学院.
9. 赵金彤. (2019). 高效吸附重金属镉的微生物筛选及其应用研究. 中国农业科学院.
10. 周鑫. (2020). 水稻功能内生微生物的筛选及其与水稻互作降低镉胁迫效应的研究. 暨南大学.
11. Andrews, J. M. (2001). [Determination of minimum inhibitory concentrations](#). *J Antimicrob Chemother.* 48 suppl 1: 5-16.

12. Jan, M., Shah, G., Masood, S., Iqbal Shinwari, K., Hameed, R., Rha, E. S. and Jamil, M. (2019). [Bacillus Cereus Enhanced Phytoremediation Ability of Rice Seedlings under Cadmium Toxicity \(researchgate.net\)](#) .*Biomed Res Int.* 2019: 8134651.
13. Lin, X., Mou, R., Cao, Z., Xu, P., Wu, X., Zhu, Z. and Chen, M. (2016). [Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains \(sciencedirect.com\)](#) .*Sci Total Environ.* 569-570: 97-104.
14. Liu, Y., Tie, B., Li, Y., Lei, M., Wei, X., Liu, X. and Du, H. (2018). [Inoculation of soil with cadmium-resistant bacterium Delftia sp. B9 reduces cadmium accumulation in rice \(Oryza sativa L.\) grains](#) .*Ecotoxicol Environ Saf.* 163: 223-229.
15. Mitra, S., Pramanik, K., Sarkar, A., Ghosh, P. K., Soren, T. and Maiti, T. K. (2018). [Bioaccumulation of cadmium by Enterobacter sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. \(researchgate.net\)](#) .*Ecotoxicol Environ Saf.* 156: 183-196.
16. Mitra, S., Pramanik, K., Ghosh, P. K., Soren, T., Sarkar, A., Dey, R. S., Pandey, S. and Maiti, T. K. (2018). [Characterization of Cd-resistant Klebsiella michiganensis MCC3089 and its potential for rice seedling growth promotion under Cd stress \(sciencedirect.com\)](#) .*Microbiol Res.* 210: 12-25.
17. Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A. and Maiti, T. K. (2018). [Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain Enterobacter aerogenes MCC 3092](#) .*J Hazard Mater.* 351: 317-329.
18. Pramanik, K., Mitra, S., Sarkar, A., Soren, T. and Maiti, T. K. (2017). [Characterization of cadmium-resistant Klebsiella pneumoniae MCC 3091 promoted rice seedling growth by alleviating phytotoxicity of cadmium](#) .*Environ Sci Pollut Res Int.* 24(31): 24419-24437.
19. Punjee, P., Siripornadulsil, W. and Siripornadulsil, S. (2018). [Reduction of cadmium uptake in rice endophytically colonized with the cadmium-tolerant](#)

- 386 [bacterium Cupriavidus taiwanensis KKU2500-3 \(nih.gov\)](#) .*Can J Microbiol.* 64(2):
387 131-145.
- 388 20. Siripornadulsil, S. and Siripornadulsil, W. (2013). [Cadmium-tolerant bacteria](#)
389 [reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial](#)
390 [bioremediation](#) .*Ecotoxicol Environ Saf.* 94: 94-103.
- 391 21. T.J.White, T.Burns,S.Lee and J.Taylor.(1999). [Amplification and direct sequencing](#)
392 [of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics](#) .*PCR Protocl.* 18(1):315-322.
- 393 22. Treesubsuntorn, C., Dhurakit, P., Khaksar, G. and Thiravetyan, P. (2018). [Effect of](#)
394 [microorganisms on reducing cadmium uptake and toxicity in rice \(Oryza sativa L.\)](#)
395 [\(baidu.com\)](#). *Environ Sci Pollut Res Int.* 25(26): 25690-25701.