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](mailto:tianjian@caas.cn)；[handongfei@caas.cn](mailto: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. CdCl2·2H2O (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)
11. KH2PO4 (北京化工厂，北化，A1049020)
12. K2HPO4·3H2O (北京化工厂，北化，A1049019)
13. Na2HPO4 (北京化工厂，北化，A1060056)
14. (NH4)2SO4 (北京化工厂，北化，A1002012)
15. MgSO4·7H2O (北京化工厂，北化，A1037003)
16. NaOH (北京化工厂，北化，A1060009)
17. Triton X-100 (Amresco公司，Amresco, 0694-1L)
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)
19. Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技股份有限公司，诺唯赞，P505-d1)
20. 琼脂糖 (Biowest公司，Biowest, 111860)
21. Gel Red核酸凝胶染液 (Biotium公司，Biotium, 41001)
22. LB培养基 (见溶液配方)
23. 1/10 LB培养基 (见溶液配方)
24. Burk培养基 (见溶液配方)
25. PDA培养基 (见溶液配方)
26. PBS缓冲液 (见溶液配方)
27. 0.1 M CdCl2溶液 (见溶液配方)
28. 75%乙醇溶液 (见溶液配方)
29. 10%次氯酸钠溶液 (见溶液配方)
30. 40%甘油 (见溶液配方)
31. 0.1 M CdCl2溶液 (见溶液配方)
32. 0.9%生理盐水 (见溶液配方)
33. 裂解液 (见溶液配方)

**仪器设备**

1. 电脑三恒多用电泳仪电源 (北京六一仪器厂，六一，DYY-10C)
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)
3. 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司，Sartorius, BSA223S)
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)
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)
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)
7. 震荡培养箱 (上海旻泉仪器有限公司，旻泉，MQT-60)
8. 水平振荡培养箱 (德国Heidolph, Heidolph, D91126)
9. PCR仪 (Bio-Rad公司，Bio-Rad, 1852148)
10. 原子吸收分光光度计 (日本岛津公司，岛津，AA-6880)
11. 多功能酶标仪 (Molecular Devices公司，Molecular Devices, SpectraMax M2)
12. pH计 (赛多利斯科学仪器有限公司，Sartorius, PB-10)
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)
14. 电磁炉 (奥克斯集团有限公司，AUX, CA2007G)
15. 微波炉 (美的集团股份有限公司，Midea, M1-L213C)

**实验步骤**

1. 功能微生物的筛选分离及纯化保存
2. 土壤中功能微生物的筛选分离及纯化保存
3. 土壤中功能微生物的筛选分离

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 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、10-4土壤悬液稀释液。各吸取200 μL土壤悬液原液和稀释液分别涂布在含有0.5 mM和1 mM CdCl2的1/10 LB培养基 (LB培养基、Burk培养基、PDA培养基) 固体平板上，吹干平板后放于30 °C生化培养箱中倒置培养4天，观察菌落生长情况 (刘爱民，2005; Siripornadulsil, 2013；林晓燕等，2015; Liu *et al.*, 2018) 。

1. 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. 水稻根系功能微生物的筛选分离及纯化保存
2. 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 μL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。

1. 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 μL研磨液，加入900 μL 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 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。

1. 筛选菌株的镉抗性和镉吸附能力评估方法
2. 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 °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CdCl2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 °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) 。

1. 筛选菌株镉吸附能力评估方法
2. 样品制备

向试管中加入含0.1 mM CdCl2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 °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 *x 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) 。

1. 标准曲线绘制

将0.1 M CdCl2溶液稀释成终浓度为0.1 mM CdCl2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×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 CdCl2 (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CdCl2的浓度 (μM) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |

1. 功能微生物的菌属鉴定
2. 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 °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 μL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 μL |
| 27F (10 μM) | 2 μL |
| 1492R (10 μM) | 2 μL |
| dNTP Mix (10 mM each) | 1 μL |
| 2× Phanta Max Buffera | 25 μL |
| Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase | 1 μL |
| ddH2O | 18 μL |
| 总体积 | 50 μL |

PCR扩增条件为：95 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s，共32个循环，72 °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。

1. 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 μL裂解液后，放入沸水中煮15分钟，自然冷却后，16,100 *x 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 μL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 μL |
| NS1 (ITS-4) | 2 μL |
| fung (ITS-5) | 2 μL |
| dNTP Mix (10 mM each) | 1 μL |
| 2× Phanta Max Buffera | 25 μL |
| Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase | 1 μL |
| ddH2O  总体积 | 18 μL  50 μL |

PCR扩增条件为：95 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 52 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s，共35个循环，72 °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。

1. 功能微生物提高水稻抗镉胁迫能力的应用
2. 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。

1. 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。

1. 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108 CFU mL-1) 。

1. 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。

1. 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。

1. 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。

1. 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。

1. 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。

1. 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。

1. 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) 。

1. 水稻样品中重金属的测定
2. 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。

1. 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) 。

1. 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) 。

1. 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

1. 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

1. Burk培养基

KH2PO4 0.8 g L-1, K2HPO4·3H2O 0.262 g L-1, (NH4)2SO4 1g L-1, MgSO4·7H2O 0.2 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，备用

1. PDA培养基

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

1. PBS缓冲液

KH2PO4 0.2 g L-1, Na2HPO4 1.15 g L-1，氯化钠8 g L-1，氯化钾0.2 g L-1，将pH调至7.4, 121 °C高压灭菌20 min，备用

1. 0.1 M CdCl2溶液

称取4.567 g CdCl2·2 1/2H2O溶于去离子水，定容至200 mL，121 °C高压灭菌20 min，备用

1. 75%乙醇溶液

量取375 mL无水乙醇，用去离子水定容至500 mL。备用

1. 10%次氯酸钠溶液

量取50 mL次氯酸钠溶液，用去离子水定容至500 mL。备用

1. 40%甘油

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

1. 0.1 M CdCl2溶液

称取4.567 g CdCl2·2 1/2H2O溶于去离子水，定容至200 mL，121 °C高压灭菌15 min，备用

1. 0.9%生理盐水

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

1. 裂解液

20 mM NaOH, 2.5% Triton X-100

**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 vietamensis 151-6 and Bacillus marisflavi 151-25 (researchgate.net)](http://www.researchgate.net/publication/340194714_An_operon_consisting_of_a_P-type_ATPase_gene_and_a_transcriptional_regulator_gene_responsible_for_cadmium_resistances_in_Bacillus_vietamensis_151-6_and_Bacillus_marisflavi_151-25) *.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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=99ccab8ef622355bc87c742b08060bce&site=xueshu_se&hitarticle=1). *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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=ae28bb911bdf17107316a595bf7f4b2d&site=xueshu_se&hitarticle=1). 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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=52ad9ac23ee6116c5fc2a94f8698b9a5&site=xueshu_se&hitarticle=1). *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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=5d09e918e37c93bcf72cdf5c789f96a5&site=xueshu_se&hitarticle=1). 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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=5ddbf051d79e704d2d587df250222b0a&site=xueshu_se&hitarticle=1). *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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=481c1fbe0c59708576f1bfad98c832c4&site=xueshu_se&hitarticle=1). 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](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=1k3c0rj00q0s0m80qm0w0aa0cp019193&site=xueshu_se&hitarticle=1). 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.](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5) *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)](http://www.researchgate.net/publication/334679174_Bacillus_Cereus_Enhanced_Phytoremediation_Ability_of_Rice_Seedlings_under_Cadmium_Toxicity) *.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)](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716312955) *.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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30055387) *.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)](http://www.researchgate.net/publication/323881354_Bioaccumulation_of_cadmium_by_Enterobacter_sp_and_enhancement_of_rice_seedling_growth_under_cadmium_stress) .*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)](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317312831) *.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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29554529) *.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](http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-0033-z) *.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 bacterium Cupriavidus taiwanensis KKU2500-3 (nih.gov)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29211972) *.Can J Microbiol.* 64(2): 131-145.
20. Siripornadulsil, S. and Siripornadulsil, W. (2013). [Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651313001735) *.Ecotoxicol Environ Saf.* 94: 94-103.
21. T.J.White, T.Burns,S.Lee and J.Taylor.(1999). [Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=af06f3192caff4f6aac9bdf3b13cde32&site=xueshu_se) .*PCR Protocl.* 18(1):315-322.
22. Treesubsuntorn, C., Dhurakit, P., Khaksar, G. and Thiravetyan, P. (2018). [Effect of microorganisms on reducing cadmium uptake and toxicity in rice (Oryza sativa L.) (baidu.com)](https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=45625640cd402ef375aa682441cb3e1b&site=xueshu_se). *Environ Sci Pollut Res Int.* 25(26): 25690-25701.