



# 镉污染水稻种子内生细菌的分离及其耐镉性和植物促生性研究

付少委<sup>1</sup>, 楚超群<sup>1</sup>, 黎妮<sup>2</sup>, 宋崇洋<sup>1</sup>, 梁爽<sup>1</sup>, 张超<sup>2</sup>, 王伟平<sup>2\*</sup>, 杨志伟<sup>1\*</sup>

1 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

2 湖南杂交水稻研究中心, 杂交水稻国家重点实验室, 湖南 长沙 410125

付少委, 楚超群, 黎妮, 宋崇洋, 梁爽, 张超, 王伟平, 杨志伟. 镉污染水稻种子内生细菌的分离及其耐镉性和植物促生性研究. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1536–1548.

Fu Shaowei, Chu Chaoqun, Li Ni, Song Chongyang, Liang Shuang, Zhang Chao, Wang Weiping, Yang Zhiwei. Isolation of endophytic bacteria from cadmium-contaminated rice seeds and their cadmium tolerance and plant growth-promoting traits. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1536–1548.

**摘要:** 【目的】植物内生细菌在促进植物生长和重金属污染土壤修复中发挥着重要作用。本研究对镉污染水稻种子内生细菌进行分离和功能鉴定, 从而确定其镉耐受性、植物促生性以及对镉胁迫下水稻种子萌发和幼苗生长的影响。【方法】采用乙醇-次氯酸钠联合灭菌法对水稻种子进行表面灭菌, 采用标准平板培养法对内生细菌进行分离、纯化; 对菌株 16S rRNA 基因进行扩增和测序, 鉴定菌株的分类学地位; 运用微量稀释法、电感耦合等离子体质谱法、比色法测定内生细菌的镉耐受性、镉去除率和植物促生性; 采用浸种法进行菌剂侵染, 观察施加菌剂对水稻种子萌发、幼苗生长和镉积累的影响。【结果】从两个水稻品种的种子中共分离得到 133 株内生细菌, 分属于 12 个属的 24 个种。在低镉品种 728B 中分离得到 83 个菌株, 主要包括假单胞菌属(34.94%)、芽孢杆菌属(28.92%)和类芽孢杆菌属(10.84%)菌株。在高镉品种博 B 中分离得到 50 个菌株, 主要包括泛菌属(40%)、短小杆菌属(22%)和微杆菌属(12%)菌株。对 24 个代表性菌株的镉耐受性进行测定, 发现镉离子对菌株的最小抑制浓度介于 80–2 560  $\mu\text{mol/L}$ , 其中芽孢杆菌 HNR-4 具有最高的镉耐受性。在含有 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  液体培养基中培养 24 h, HNR-4 对镉的去除率达到 77.57%。对 24 个菌株的植物促生性测定发现, IAA 合成量为 0.78–40.12  $\mu\text{g/mL}$ ; 铁载体产生量为 1.46–752.74  $\text{mg/L}$ ; 溶磷

**基金项目:** 湖南省农业科技创新基金项目(2018QN03); 长沙市科技计划(kq1801033)

Supported by Agricultural Science-Technology Innovation Fund of Hunan Province, China (2018QN03) and by the Science and Technology Program of Changsha, China (kq1801033)

\*Corresponding authors. WANG Weiping, Tel: +86-731-82872839, E-mail: 15111034840@126.com; YANG Zhiwei, Tel: +86-10-68902044, E-mail: yangzw@cnu.edu.cn

Received: 10 September 2021; Revised: 19 October 2021; Published online: 28 February 2022

量为 0–3.10 mg/L; ACC 脱氨酶比活力为 0–9.22 U/mg。施加芽孢杆菌 HNR-4 菌剂显著提高了镉胁迫下水稻种子萌发率和幼苗茎叶长, 减小了镉离子由根部向地上部分的转移系数。【结论】尽管不同镉污染水稻品种的种子内生细菌组成存在一定差异, 但这些内生细菌均有不同程度的耐镉性和植物促生性。对耐镉内生细菌的分离和鉴定, 有助于进一步探讨重金属污染下内生细菌与植物互作机制以及微生物应用于农田重金属污染修复的潜力。

**关键词:** 镉污染; 水稻种子; 内生细菌; 重金属耐受性; 植物生长促进性

## Isolation of endophytic bacteria from cadmium-contaminated rice seeds and their cadmium tolerance and plant growth-promoting traits

FU Shaowei<sup>1</sup>, CHU Chaoqun<sup>1</sup>, LI Ni<sup>2</sup>, SONG Chongyang<sup>1</sup>, LIANG Shuang<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>2</sup>, WANG Weiping<sup>2\*</sup>, YANG Zhiwei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, Hunan, China

**Abstract: [Objective]** Endophytes play an important role in the promotion of plant growth and the remediation of heavy metal-contaminated soil. In this study, we isolated the endophytic bacteria from cadmium-contaminated rice seeds and analyzed their cadmium tolerance, plant growth-promoting traits, and effects on rice seed germination and seedling growth under cadmium stress. **[Methods]** First, we used ethanol and sodium hypochlorite to sterilize the surface of rice seeds and then isolated the endophytic bacteria by standard dilution plating method. Second, we amplified and sequenced the 16S rRNA genes of the strains and identified their taxonomic positions. Third, we analyzed the cadmium tolerance, cadmium removal rate, and plant growth-promoting traits of the endophytic bacteria via microdilution method, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), and spectrophotometry, respectively. Finally, we infected the rice seeds with bacterial inoculants to observe their effects on seed germination, seedling growth, and cadmium accumulation. **[Results]** We isolated a total of 133 endophyte strains belonging to 24 species of 12 genera from two rice cultivars. Eighty-three strains were isolated from low-Cd-accumulating cultivar 728B, including *Pseudomonas* (34.94%), *Bacillus* (28.92%), and *Paenibacillus* (10.84%). Fifty strains were isolated from high-Cd-accumulating cultivar BB, including *Pantoea* (40%), *Curtobacterium* (22%), and *Microbacterium* (12%). The minimum inhibitory concentrations of cadmium against 24 representative strains were 80–2 560  $\mu\text{mol/L}$ . *Bacillus* sp. HNR-4 showed the highest cadmium tolerance. The cadmium removal rate of HNR-4 reached 77.57% after the strain was cultured in the liquid medium containing 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  for 24 h. Most of the 24 strains were capable of producing plant growth-promoting substances, such as IAA (0.78–40.12  $\mu\text{g/mL}$ ), siderophore (1.46–752.74 mg/L), soluble phosphate (0–3.10 mg/L), and ACC deaminase (0–9.22 U/mg). Under cadmium stress, HNR-4 inoculant significantly increased the germination rate and seedling shoot length, while reduced the transfer coefficient of cadmium from root to shoot. **[Conclusion]** Although the

composition of seed endophytic bacteria varied in different rice cultivars, these bacteria all showed different levels of cadmium tolerance and plant growth-promoting activities. Isolation and identification of Cd-resistant endophytic bacteria may help investigate the interaction between endophytic bacteria and host plants exposed to heavy metal contamination, and explore the potential of microbial remediation in farmland.

**Keywords:** cadmium contamination; rice seed; endophytic bacteria; heavy metal tolerance; plant growth promotion

植物内生细菌(endophytic bacteria)指生活于健康植物各种组织和器官内部、而不会引起明显病症的细菌。植物种子中含有大量内生和附生细菌群落, 它们的组成和垂直传播可能直接或间接影响种子萌发、植物生长和健康, 并成为下一代宿主植物内生菌的来源<sup>[1-3]</sup>。

一些研究报道了水稻种子可培养内生细菌主要来自 *Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Firmicutes*、*Actinobacteria* 和 *Bacteroidetes*。优势菌属包括根瘤菌属(*Rhizobium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、泛菌属(*Pantoea*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)和微杆菌属(*Microbacterium*)等<sup>[4-9]</sup>。植物内生细菌具有多种生物学功能, 例如通过合成植物激素(生长素、细胞分裂素和赤霉素等)促进植物生长, 通过分泌铁载体、固氮和溶磷活性促进植物对营养元素铁、氮和磷的获取<sup>[3]</sup>。此外, 一些内生细菌可以通过合成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶来降低植物激素乙烯的水平, 缓解胁迫条件下乙烯对植物生长的抑制。植物内生菌还可利用一些间接机制促进植物生长, 包括合成抗生素抑制植物病原体、诱导植物系统抗性等<sup>[3]</sup>。

植物微生物(包括根际细菌和内生细菌)在

促进重金属胁迫下植物的生长以及重金属污染修复方面也发挥着重要作用<sup>[10-12]</sup>。一方面, 植物微生物可以辅助植物修复, 通过酸化根际环境、溶解金属矿物、提高根表面积等机制促进超积累植物对重金属的吸收, 提高植物提取的效率<sup>[13-15]</sup>; 另一方面, 植物微生物采用原位钝化的方式, 通过吸附、吸收、沉淀、络合、转化等方式对重金属离子进行固定或清除, 降低重金属离子的可获得性, 从而减轻重金属胁迫对植物的损害, 降低重金属在植物体内的积累, 实现粮食作物的安全生产<sup>[11]</sup>。

目前, 许多文献报道了从重金属超富集植物(例如东南景天、芥菜、龙葵)等分离出重金属耐受细菌, 并用于研究超富集植物-内生菌相互作用以及植物-微生物联合修复<sup>[16-18]</sup>。水稻是一种易于积累重金属的重要粮食作物<sup>[19-20]</sup>, 但对重金属污染下水稻内生细菌的分离和鉴定还鲜有报道。水稻品种 728B 和博 B 分别是湖南杂交水稻研究中心选育的籽粒低镉积累和高镉积累品种。本研究以这 2 个水稻品种为实验材料, 对镉污染水稻种子的内生细菌进行分离和纯化, 并对菌株的耐镉性和植物促生性进行测定, 探讨耐镉内生细菌对水稻幼苗生长的影响, 为开展重金属污染农田的微生物修复提供更多的菌种资源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

水稻(*Oryza sativa* L.)种子由湖南杂交水稻

研究中心王伟平副研究员提供。2018年10月收集水稻种子并分类标号,低温存放备用。728B和博B为籼稻品种。经过几年栽培实验,证实不同程度的镉污染条件下,728B籽粒中镉含量较低(0.08–0.48 mg/kg),属于低镉积累品种,而博B籽粒镉含量较高(0.37–0.91 mg/kg),属于高镉积累品种。杂交水稻C两优188(C815S ♀×R188 ♂)用于细菌侵染的幼苗实验。

## 1.2 培养基及试剂

### 1.2.1 培养基

(1) LB培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10; (2) NB培养基(g/L): 胰蛋白胨 5, 牛肉膏 3, 氯化钠 5; (3) TSB培养基(g/L): 胰蛋白胨 15, 大豆蛋白胨 5, 氯化钠 5; (4) R<sub>2</sub>A培养基(g/L): 胰蛋白胨 0.25, 酸水解酪蛋白 0.5, 酵母浸粉 0.5, 可溶性淀粉 0.5, 磷酸氢二钾 0.3, 硫酸镁 0.1, 丙酮酸钠 0.3, 蛋白胨 0.25, 葡萄糖 0.5。固体平板是在液体培养基中按 1.5%的比例加入琼脂粉; (5) 木村培养液(mg/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 48.2、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24.8、KNO<sub>3</sub> 18.5、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15.9、MgSO<sub>4</sub> 135.1、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 86.4、H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.09、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.81、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.08 和 NaFeEDTA 7.34。

### 1.2.2 试剂

10 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 溶液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用; PCR 扩增所用试剂购自北京六合通经贸有限公司, 引物 27F 和 1492R 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.3 水稻种子表面灭菌

称量 0.5 g 水稻种子, 先用无菌水清洗几遍, 再依次用 70%乙醇溶液浸泡 3 min, 2.5%的次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 70%乙醇溶液清洗 30 s, 最后用无菌水清洗 5–7 次<sup>[8]</sup>。取最后一次无菌水清洗液 100 μL 涂布 LB 固体培养基,

30 °C 培养 48–72 h, 以检查表面灭菌效果。

## 1.4 水稻种子内生细菌的分离与纯化

用无菌研钵将表面灭菌的水稻种子研磨成粉末, 按质量体积比 1:9 加无菌水或者磷酸盐缓冲液, 取 100 μL 种子悬浊液分别加入到两组装有 30 mL 1/2 LB、NB、TSB、1/2 R<sub>2</sub>A 或 1/4 R<sub>2</sub>A 液体培养基的锥形瓶中, 将一组锥形瓶放置于 28 °C 恒温培养箱中, 180 r/min 摇床中孵育 24 h; 另一组锥形瓶 25 °C 常温静置培养至液体培养基浑浊。同时, 取 30 μL 种子悬浊液加入到分别装有 1/2 LB、NB、TSB、1/2 R<sub>2</sub>A 或 1/4 R<sub>2</sub>A 的 96 孔板中, 总体积 300 μL, 28 °C 孵育至小孔中培养基浑浊。将摇培、静置培养和 96 孔板小孔中的细菌培养物进行适度稀释, 取 100 μL 分别涂布在相应的 1/2 LB、NB、TSB、1/2 R<sub>2</sub>A 或 1/4 R<sub>2</sub>A 固体平板上, 每个样品 3 个重复。根据平板上菌落的形态(表面光泽度、透明度、大小、颜色、形状、边缘整齐度等)随机挑取具有代表性的单菌落, 分离纯化后–80 °C 冰箱保存备用。

## 1.5 菌株的 16S rRNA 基因序列分析和分类归属

以细菌基因组 DNA 为模板, 用通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 扩增的 PCR 产物送北京华大基因科技有限公司进行测序, 将序列上传至 EzTaxon server (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进行比对, 分析与模式菌株的序列同源关系, 确定菌株的分类学地位。

## 1.6 菌株的耐镉性测定

参照 Wiegand 等<sup>[21]</sup>的方法将不同浓度的 LB+CdCl<sub>2</sub> 溶液分别加到无菌的 96 孔板中, 第 1–10 孔加 LB+CdCl<sub>2</sub> 溶液, 每孔 50 μL, 第 11 孔加 100 μL LB, 第 12 孔加 50 μL LB。将相当于 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液(约 1–2×10<sup>8</sup> CFU/mL), 经

LB 培养基 1:100 稀释后, 向第 1–10 孔和 12 孔中各加 50  $\mu\text{L}$ , 使  $\text{Cd}^{2+}$  终浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320、640、1 280、2 560  $\mu\text{mol/L}$ 。第 11 孔为无菌阴性对照, 第 12 孔为无镉条件下菌株生长的阳性对照。密封后置于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 16–20 h 观察结果。选取能观察到菌液浑浊与清亮的相邻两孔, MIC 终点值记为没有明显生长的最小  $\text{Cd}^{2+}$  浓度。每个菌株每个浓度 3 个重复。

### 1.7 菌株的植物促生性测定

参照 Glickmann 等<sup>[22]</sup>的方法, 运用 Salkowski 法测定菌株合成 IAA 的产量; 参照 Schwyn 等<sup>[23]</sup>的方法, 利用 CAS 蓝色检测液测定菌株合成铁载体的产量; 参照孙亚凯<sup>[24]</sup>的方法, 利用钼锑抗显色剂测定菌株的溶磷量; 参照 Penrose 等<sup>[25]</sup>的方法, 测定分离菌株 ACC 脱氨酶的比活力。每个菌株设置 3 个重复, 记录数据。

### 1.8 菌株对镉离子去除率测定

参照 Zhou 等<sup>[26]</sup>的方法: 配制含 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  的 LB 培养液, 按比例加入饱和菌液, 使菌体终浓度为 1 g/L。以不加菌的含相同浓度  $\text{CdCl}_2$  的 LB 培养基为空白对照。在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 的恒温摇床中扩大培养 24 h。取 10 mL 菌液于常温离心机, 7 000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上清用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 用 ICP-MS (电感耦合等离子体质谱仪) 测定溶液中剩余的  $\text{Cd}^{2+}$  含量。计算细菌的  $\text{Cd}^{2+}$  去除能力。

### 1.9 菌株对水稻种子萌发和幼苗生长和镉积累的影响

选取饱满的 C 两优 188 水稻种子用无菌水清洗几遍, 对种子表面进行灭菌, 随后在 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中暗处浸泡 12 h。菌剂处理组: 将浸泡 12 h 的水稻种子转移至细菌饱和培养物中浸种 12 h, 单菌剂  $10^8$  CFU/mL, 复合菌剂为 2 个菌

株的饱和培养物( $10^8$  CFU/mL)按体积比 1:1 混合。空白对照组: 继续在 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中暗处浸泡 12 h。之后将种子转移至装有珍珠岩和木村培养液(含有 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ )的无菌组培瓶中, 木村培养液刚刚没过珍珠岩, 以不加  $\text{CdCl}_2$  的木村培养液为对照。将组培瓶置于光照 14 h/黑暗 10 h, 光强 3 000 lx, 温度 28  $^{\circ}\text{C}$ /20  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 70% 的光照培养箱中培养。

生长至第 4 天, 统计水稻种子的萌发率, 生长至第 15 天时采集全部水稻样品, 测定幼苗的根长、株高和鲜重。之后将幼苗置于 105  $^{\circ}\text{C}$  烘箱内杀青 30 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  烘干 48 h, 将烘干后的幼苗加液氮研磨成粉, 采用 ICP-MS 测定幼苗的镉含量, 计算镉的转移系数[转移系数=(地上部分镉含量/地下部分镉含量) $\times$ 100%]。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻种子可培养细菌的多样性分析

利用 5 种培养基(1/2 LB、NB、TSB、1/2 R<sub>2</sub>A 和 1/4 R<sub>2</sub>A), 通过传统培养法共分离得到 133 株内生细菌 (GenBank 登录号 OK035336–OK035441)。其中, 从低镉品种 728B 中分离得到 83 个菌株, 而在高镉品种博 B(BB) 中分离得到 50 个菌株(表 1)。

对分离得到的内生细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增、测序和序列比对, 共鉴定出 12 个属的 24 个种, 结果如表 1 所示。在 728B 与博 B 种子中皆存在芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)和黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)的菌株。在 728B 中还分离得到假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)菌株; 在博 B 中还分离得到小短杆菌属

(*Brachybacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和微杆菌属(*Microbacterium*)的菌株。

在 728B 种子中丰度最高的是假单胞菌属(*Pseudomonas*), 占比为 34.94%, 排名第二的是芽孢杆菌属(*Bacillus*), 占比为 28.92%, 随后是类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*), 占比为 10.84%。

而在博 B 种子中丰度最高的是泛菌属(*Pantoea*), 占比为 40%, 排名第二的是短小杆菌属(*Curtobacterium*), 占比为 22%, 随后是微杆菌属(*Microbacterium*), 占比为 12% (图 1)。可见低镉品种 728B 和高镉品种博 B 种子中内生细菌的数量、多样性和丰度存在一定差异。

表 1 水稻种子可培养内生细菌的分类鉴定

Table 1 Classification of culturable endophytic bacteria in rice seeds

Cultivars	Top-hit taxon	No. of isolates	Accession No.	Similarity/%
728B	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	29	BBIT01000012	99.71
	<i>Bacillus megaterium</i>	11	JJMH01000057	99.93
	<i>Paenibacillus turicensis</i>	9	AF378694	99.37
	<i>Curtobacterium luteum</i>	7	X77437	99.92
	<i>Pantoea dispersa</i>	4	DQ504305	100.00
	<i>Xanthomonas sacchari</i>	4	Y10766	99.86
	<i>Bacillus altitudinis</i>	3	ASJC01000029	100.00
	<i>Bacillus toyonensis</i>	3	CP006863	100.00
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	2	EF114313	99.93
	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	2	ASJD01000027	99.79
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2	ACNF01000156	99.93
	<i>Citrobacter bitternis</i>	2	KJ817168	99.71
	<i>Bacillus siamensis</i>	1	AJVF01000043	99.64
	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	1	CP001001	99.78
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	AJ233423	99.71
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	UHDF01000003	100.00
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	LILF01000056	100.00
BB	<i>Pantoea dispersa</i>	20	DQ504305	100.00
	<i>Curtobacterium luteum</i>	11	X77437	99.92
	<i>Flavobacterium acidificum</i>	4	JX986959	99.34
	<i>Microbacterium hydrothermale</i>	4	HM222660	99.27
	<i>Xanthomonas sacchari</i>	3	Y10766	99.86
	<i>Bacillus paramycooides</i>	2	MAOI01000012	99.93
	<i>Microbacterium testaceum</i>	2	BJML01000022	99.93
	<i>Paenibacillus cineris</i>	1	AJ575658	99.86
	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	1	KX865140	99.86
	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	1	AJ415377	100.00
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	1	CP001001	99.78	

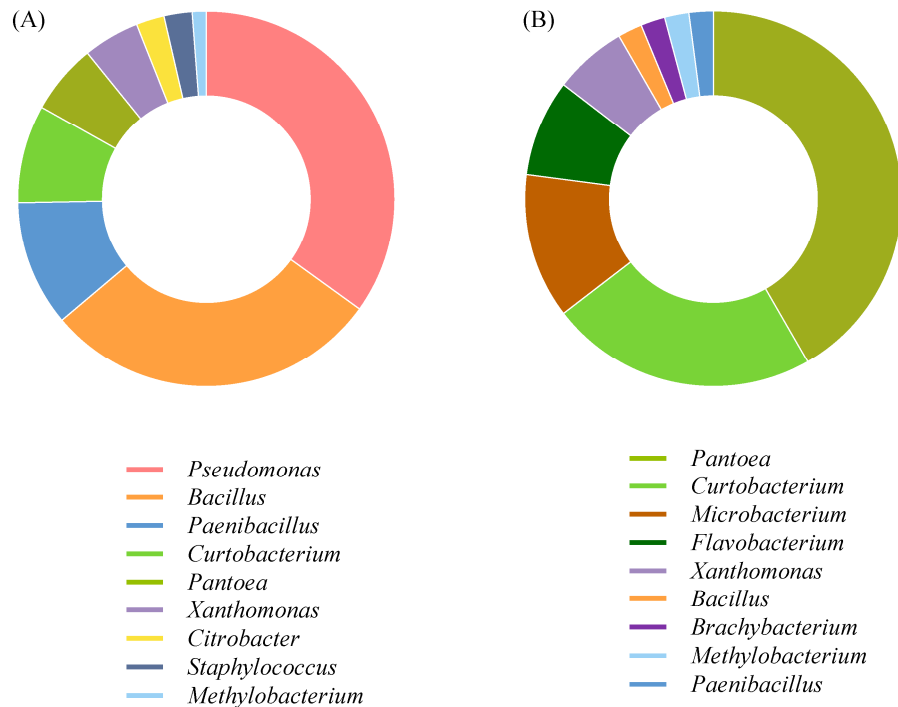


图 1 水稻 728B (A)和博 B (B)种子可培养内生细菌的多样性

Figure 1 Diversity of seed culturable endophytic bacteria in rice 728B (A) and BB (B).

## 2.2 内生细菌对镉离子的耐受性(最小抑制浓度, MIC)

镉离子对 24 个菌株的最小抑制浓度(MIC)大多介于 80–2 560  $\mu\text{mol/L}$  (表 2)。其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株 HNR-4 和 74RP-2 耐镉性最强, MIC 达到 2 560  $\mu\text{mol/L}$ 。短小杆菌属(*Curtobacterium*)菌株 7962R-1 的 MIC 最小, 不足 5  $\mu\text{mol/L}$ 。

## 2.3 内生细菌的植物促生性

测定 24 个菌株的植物促生性, 发现 IAA 合成量为 0.78–40.12  $\mu\text{g/mL}$ , 合成量最高的是 *Pantoea* sp. 7T37-2; 铁载体产生量为 1.46–752.74  $\text{mg/L}$ , 最高的是 *Xanthomonas* sp. 7N25-2; ACC 脱氨酶活力为 0–9.22  $\text{U/mg}$ , 其中 *Bacillus* sp. 7NZ-3 的酶活力最高; 无机磷溶解量为 0–3.10  $\text{mg/L}$ , 活性最高的是 *Staphylococcus* sp. 74RZ-5 (表 2)。综合 4 个植物促生性指标, *Bacillus* sp. 7NZ-3 和 *Microbacterium*

sp. BT96-1 的植物促生性总体较高。

## 2.4 芽孢杆菌 HNR-4 和 7NZ-3 对镉离子的去除率

由于菌株 *Bacillus* sp. HNR-4 的耐镉性最强, MIC 为 2 560  $\mu\text{mol/L}$ , 而菌株 *Bacillus* sp. 7NZ-3 的 4 个植物促生性指标相对较高, 为了对比和评估这 2 个表型相异的菌株在重金属污染修复中的潜力, 测定了它们对镉离子的去除能力。经过在含 1  $\text{mg/L}$   $\text{CdCl}_2$  的 LB 液体培养基中培养 24 h, *Bacillus* sp. HNR-4 对培养基中  $\text{Cd}^{2+}$  的去除率达到 77.57% $\pm$ 1.14%, 而 *Bacillus* sp. 7NZ-3 对  $\text{Cd}^{2+}$  的去除率仅为 26.47% $\pm$ 0.42%, 二者差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 2.5 芽孢杆菌 HNR-4 和 7NZ-3 对水稻萌发、生长和镉积累的影响

### 2.5.1 芽孢杆菌侵染后水稻种子的萌发率

水稻种子萌发 4 d 后计算发芽率, 结果如图 2A 所示。不施加菌剂时, 有镉组(Cd-CK)的

表 2 内生细菌的 Cd<sup>2+</sup>-MIC 和植物促生性的测定Table 2 Determination of Cd<sup>2+</sup>-MIC and plant growth promotion traits of endophytic bacteria

Number	Top-hit taxon	MIC/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	IAA/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Siderophore/ ( $\text{mg/L}$ )	ACC deaminase/ (U/mg)	Phosphate solubilization/ ( $\text{mg/L}$ )
7LP-1	<i>Bacillus altitudinis</i>	1 280	0.78 $\pm$ 0.33	6.40 $\pm$ 0.74	8.56 $\pm$ 3.44	1.41 $\pm$ 0.27
7NZ-3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	80	27.74 $\pm$ 0.66	46.37 $\pm$ 0.52	9.22 $\pm$ 4.88	0.45 $\pm$ 0.07
74RZ-6	<i>Bacillus megaterium</i>	320	22.24 $\pm$ 0.89	39.48 $\pm$ 2.10	1.33 $\pm$ 0.39	0.59 $\pm$ 0.03
HNR-4	<i>Bacillus paramycooides</i>	2 560	1.82 $\pm$ 0.05	6.40 $\pm$ 1.62	6.92 $\pm$ 2.24	1.04 $\pm$ 0.01
74RP-4	<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	160	0.99 $\pm$ 0.09	14.10 $\pm$ 0.47	0	0.18 $\pm$ 0.01
7LZ-2	<i>Bacillus siamensis</i>	320	4.95 $\pm$ 1.11	18.94 $\pm$ 2.20	0	0.13 $\pm$ 0.02
74RP-2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2 560	1.28 $\pm$ 0.24	10.17 $\pm$ 0.84	3.05 $\pm$ 0.15	0.77 $\pm$ 0.01
72RZ-2	<i>Bacillus toyonensis</i>	1 280	1.40 $\pm$ 0.19	5.45 $\pm$ 2.03	5.02 $\pm$ 2.33	0.69 $\pm$ 0.08
HNR-14	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	80	31.39 $\pm$ 0.95	56.99 $\pm$ 0.15	0	2.37 $\pm$ 0.11
BT25-3	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	320	2.69 $\pm$ 0.45	59.86 $\pm$ 2.15	0	0.21 $\pm$ 0.07
HNR-7	<i>Citrobacter bitternis</i>	640	33.28 $\pm$ 0.99	8.65 $\pm$ 3.45	0	0
7962R-1	<i>Curtobacterium luteum</i>	<5	3.57 $\pm$ 0.14	15.50 $\pm$ 0.90	0.68 $\pm$ 0.24	1.28 $\pm$ 0.05
BT28-1	<i>Flavobacterium acidificum</i>	640	29.78 $\pm$ 0.90	1.92 $\pm$ 0.08	0	0
B2R25-2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	1 280	1.22 $\pm$ 0.30	3.43 $\pm$ 0.02	0	0
BT96-1	<i>Microbacterium hydrothermale</i>	80	34.69 $\pm$ 0.64	41.90 $\pm$ 3.19	5.24 $\pm$ 0.61	1.33 $\pm$ 0.17
B2R25-7	<i>Microbacterium testaceum</i>	80	28.25 $\pm$ 1.34	50.96 $\pm$ 0.90	0	1.91 $\pm$ 0.17
B2R25-4	<i>Paenibacillus cineris</i>	320	2.61 $\pm$ 0.11	28.86 $\pm$ 2.26	3.64 $\pm$ 3.47	1.82 $\pm$ 0.11
7N25-1	<i>Paenibacillus turicensis</i>	/	/	/	/	/
7T37-2	<i>Pantoea agglomerans</i>	160	40.12 $\pm$ 0.60	5.70 $\pm$ 1.12	0	0
72R25-1	<i>Pantoea dispersa</i>	320	11.81 $\pm$ 0.92	6.15 $\pm$ 2.47	3.53 $\pm$ 1.27	0
7N25-3	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1 280	13.77 $\pm$ 0.39	19.39 $\pm$ 1.96	4.47 $\pm$ 0.34	1.08 $\pm$ 0.15
74RZ-5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 280	1.74 $\pm$ 0.04	2.93 $\pm$ 0.20	0	3.10 $\pm$ 0.30
7NZ-2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	640	2.45 $\pm$ 0.32	1.46 $\pm$ 0.10	1.79 $\pm$ 0.30	3.02 $\pm$ 0.06
7N25-2	<i>Xanthomonas sacchari</i>	80	1.24 $\pm$ 0.09	752.74 $\pm$ 17.81	0	1.38 $\pm$ 0.01

/: Data are not available because these strains do not grow or grow poorly in the corresponding assay media.

种子萌发率为 69.52%，与无镉组(CK)的萌发率(78.10%)相比显著降低( $P<0.05$ )，可见镉胁迫对 C 两优 188 水稻种子萌发有抑制作用。采用浸种法施加菌剂后，无论有无镉组或有镉组，菌株 HNR-4、7NZ-3 或者二者的混合菌剂都可以提高水稻种子的萌发率，其中 HNR-4 处理后种子萌发率最高，达到 89.91% (无镉组)和 84.26% (有镉组)，与对照相比均具有显著性差异( $P<0.05$ )。

### 2.5.2 芽孢杆菌侵染后水稻幼苗的生长情况

施加菌剂后水稻幼苗的生长如图 2B, 2C, 2D 所示。在无镉组，施加 7NZ-3、7NZ-3+HNR-4 复合菌剂显著提高了水稻幼苗的根长和株高

( $P<0.05$ )，施加 HNR-4 对根长和株高没有明显影响。在有镉组，施加 7NZ-3 和复合菌剂也显著提高了幼苗的根长和株高( $P<0.05$ )，施加 HNR-4 对幼苗株高有显著促进效果( $P<0.05$ )。以上结果显示，无论有无镉组或有镉组，7NZ-3 都可以明显提高水稻幼苗的根长和株高，这与它具有较好的植物促生性指标相一致。复合菌剂似乎综合了 HNR-4 耐镉性强而 7NZ-3 促生性高的优势，镉胁迫下复合菌剂处理后幼苗的根长和株高都是最高的。在无镉或有镉条件下，施加各菌剂后幼苗鲜重有所增加，但差异不显著(结果未显示)。



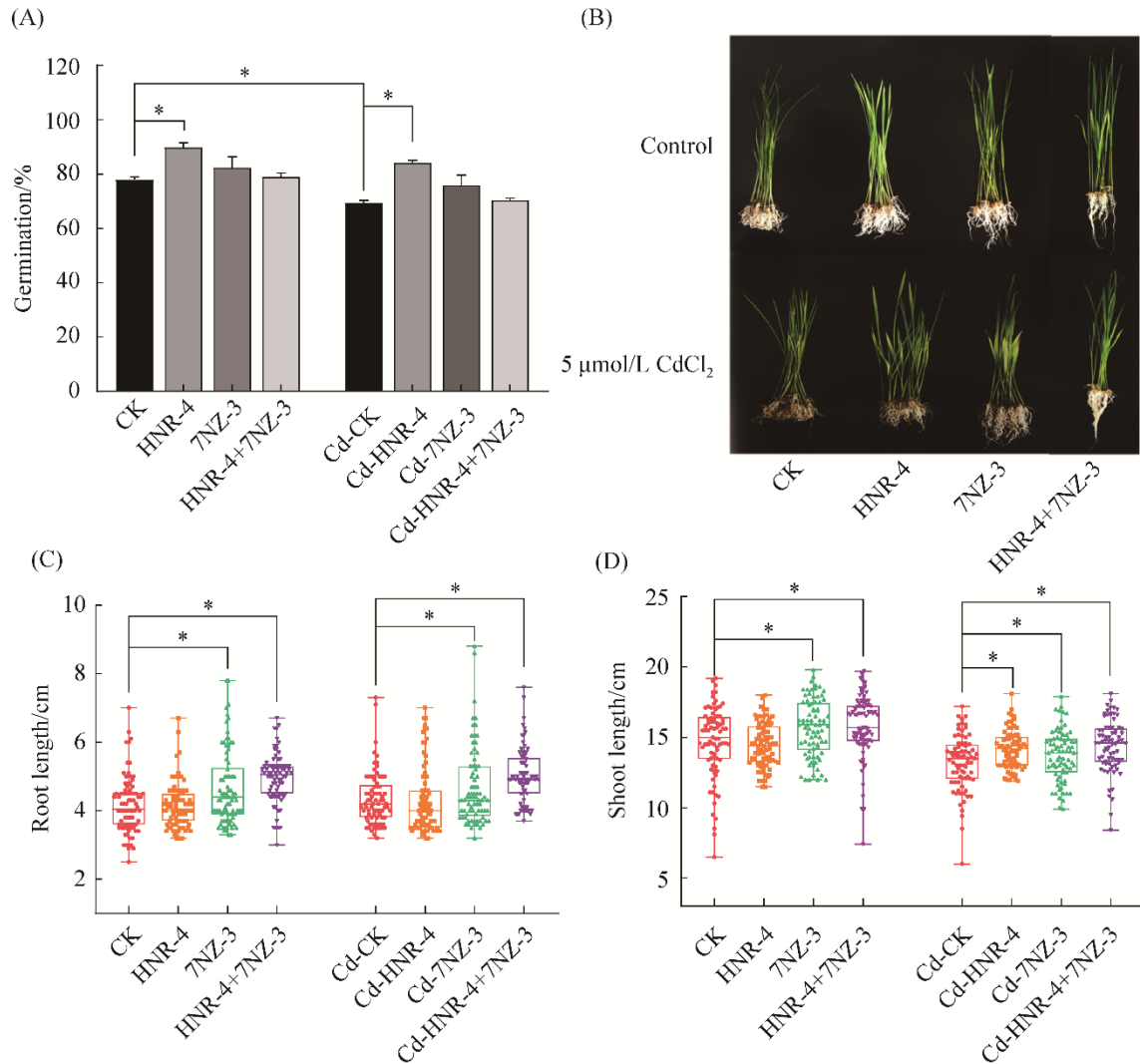


图 2 芽孢杆菌侵染后水稻种子的萌发和幼苗的生长情况

Figure 2 Germination and the growth of rice seedlings after *Bacillus* inoculation. A: germination rates; B: seedlings; C: root length; D: shoot length. The lines at the top, bottom, and middle of each box in C and D correspond to the 75th, 25th, and 50th percentiles (median), respectively. The ends of whiskers correspond to the minimum and maximum value. The asterisks denote significant differences between control and treatments at  $P < 0.05$ .

2.5.3 芽孢杆菌侵染后水稻幼苗的镉含量

对水稻幼苗根和茎叶中镉含量进行测定 (表 3), 可见施加 HNR-4 菌剂后, 根中镉含量

显著增加, 而茎叶中镉含量显著降低, 镉由根部向地上部分运输的转移系数显著降低 ( $P < 0.05$ ); 施加 7NZ-3 菌剂, 茎叶和根中的镉含量

表 3 水稻幼苗中镉含量及转移系数

Table 3 Cadmium content and transfer coefficient in rice seedlings

Treatments	Cd content in shoots/(mg/kg)	Cd content in roots/(mg/kg)	Transfer coefficient/%
Cd-CK	17.37±0.09 b	242.00±2.83 c	7.18±0.01 a
Cd-HNR-4	15.47±0.17 d	254.33±0.94 b	6.08±0.09 c
Cd-7NZ-3	17.90±0.37 a	275.00±4.32 a	6.51±0.17 b
Cd-HNR-4+7NZ-3	16.65±0.01 c	227.65±4.43 d	7.32±0.00 a

The different lowercase letters in the same column indicate significant differences among treatments at  $P < 0.05$ .

都有显著增加,但转移系数也显著下降( $P<0.05$ );施加 HNR-4 和 7NZ-3 的复合菌剂,根和茎叶中的镉含量都显著降低,转移系数与对照相比无显著差异。

### 3 讨论与结论

本实验研究的水稻低镉品种 728B 和高镉品种博 B 均来自湖南镉污染稻田。前期研究表明,当土壤有效镉含量为 0.45–2.30 mg/kg,728B 籽粒镉积累量为 0.08–0.48 mg/kg,博 B 籽粒镉积累量为 0.37–0.91 mg/kg,二者具有显著差异。本文对 728B 和博 B 种子可培养内生细菌进行分离和鉴定,揭示出 2 个品种虽然具有共同的细菌类群,但在优势菌属的丰度上存在一定差异。728B 的优势菌属是假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*),而博 B 的优势菌属为泛菌属(*Pantoea*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)和微杆菌属(*Microbacterium*)。

水稻作为一种极易富集重金属的重要粮食作物,然而对重金属胁迫下内生菌群与水稻的互作机理了解甚少。目前,对重金属污染条件下植物内生菌群的研究主要集中在重金属超积累植物上。一些研究表明,重金属超积累植物可以通过募集具有重金属抗性和植物促生性的细菌类群,促进其在重金属污染条件下生长,同时这些内生细菌对植物吸收重金属也产生一定影响<sup>[27–31]</sup>。例如,在超积累植物东南景天(*Sedum alfredii*)中,链霉菌科(*Streptomycetaceae*)、类诺卡氏菌科(*Nocardioideae*)和假诺卡氏菌科(*Pseudonocardiaceae*)的丰度与东南景天茎叶生物量的增加和总 Cd/Zn 的积累密切相关。在东南景天上接种与这些细菌类群亲缘关系相近的混合菌剂,可以显著提升植物生物量、根系形态和 Cd/Zn 积累<sup>[15]</sup>。本文观察到低镉品种 728B 和高镉品种博 B 优势菌属的种类和丰度存在一定差异。在低镉品种 728B 中富集 *Pseudomonas*、

*Bacillus* 和 *Paenibacillus*,这些菌属的菌株是常见的植物促生细菌(PGPB),可以通过合成 ACC 脱氨酶、铁载体和胞外聚合物(EPS)促进植物在重金属胁迫条件下生长<sup>[11]</sup>。一些研究报道了 *Pseudomonas* 和 *Bacillus* 菌株可以通过降低土壤中镉离子的可获得性而降低水稻籽粒的镉积累<sup>[32–35]</sup>。在高镉品种博 B 种子中富集 *Pantoea*、*Curtobacterium* 和 *Microbacterium*。*Pantoea* 的一些菌株也是常见的 PGPB,有研究发现 *Pantoea* 菌株可以降低水稻植株的 As 含量<sup>[4,36]</sup>,但对水稻籽粒积累重金属的影响尚未见报道。*Curtobacterium* 和 *Microbacterium* 也是常见的水稻种子内生细菌<sup>[37]</sup>,但尚不清楚这些内生细菌对镉污染下水稻生长、抗逆和镉积累的作用。因此,尚需对不同镉积累水平的水稻品种内生细菌的组成及其功能意义进行深入研究。

本文进一步对水稻种子内生细菌的耐镉性进行了测定,发现绝大多数内生细菌具有镉耐受性,其中 *Bacillus* sp. HNR-4 和 74RP-2 的镉最小抑制浓度(MIC)最高,达到 2 560  $\mu\text{mol/L}$ 。在含 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  的液体培养基中培养 24 h 后,HNR-4 可使培养基中的镉离子下降 77.57%,说明菌体对镉离子产生了吸附和结合。之前有研究报道,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) H3 和阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)T61 对含镉培养基中  $\text{Cd}^{2+}$  具有较高的去除率<sup>[34–35,38]</sup>。芽孢杆菌细胞壁中含有大量肽聚糖和磷壁酸,可以提供大量的羧基、酰胺基、羟基等活性基团,可以通过静电吸引、离子交换或络合作用吸附重金属离子<sup>[39]</sup>。另外,前期在扫描电镜下观察到菌株 HNR-4 在  $\text{Cd}^{2+}$  处理后细胞局部皱缩,表面被大量丝状物包裹,推测 HNR-4 可能分泌胞外聚合物对  $\text{Cd}^{2+}$  进行结合,从而减少其对细胞的损害。

胁迫条件下,内生细菌还可以通过促进植

物生长缓解重金属胁迫<sup>[11]</sup>。本文对 24 个代表性菌株合成生长激素、铁载体、ACC 脱氨酶, 以及溶磷活性进行测定, 结果表明大多数内生细菌具有 1–4 项促生活性。其中, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*) 菌株的 4 个促生性指标都比较高。假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株具有较高的合成铁载体和 ACC 脱氨酶活性, 泛菌属 (*Pantoea*) 菌株合成 IAA 和 ACC 脱氨酶的活性较高。微生物可以通过合成生长激素促进植物根系的生长, 通过将不溶性磷化合物转化为植物可利用的形式提高磷的有效性<sup>[11]</sup>。微生物合成的铁载体不仅可以帮助植物获取 Fe 元素, 同时铁载体还可以与有毒金属结合, 降低游离重金属离子的可获得性<sup>[40–41]</sup>。重金属胁迫通常可导致乙烯的合成量增加, 过量的乙烯会导致根系伸长减少、过氧化氢积累和诱导细胞凋亡<sup>[42]</sup>。细菌分泌的 ACC 脱氨酶可以降解乙烯合成的直接前体 ACC, 从而降低植物的乙烯水平, 促进其根系生长<sup>[43]</sup>。因此, 在胁迫条件下 ACC 脱氨酶活性对于促进植物生长非常有效。为了获得可缓解植物重金属胁迫的最佳细菌, 建议对菌株进行重金属抗性筛选后, 对菌株产生 ACC 脱氨酶的能力进行鉴定<sup>[11]</sup>。

一些研究报道了接种适当的微生物可以减少水稻籽粒中镉的积累, 提高水稻品质, 这些微生物包括芽孢杆菌属<sup>[34–35,38]</sup>、假单胞菌属<sup>[32–33]</sup>、贪铜菌属 (*Cupriavidus*)<sup>[44–45]</sup> 和寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)<sup>[32]</sup> 等。其中, 芽孢杆菌是常见的植物促生细菌 (PGPB), 因其具有较高的环境兼容性和重金属离子吸附性在重金属污染修复领域得到广泛应用<sup>[11,39]</sup>。本研究选择耐镉性强的 *Bacillus* sp. HNR-4 和植物促生性较好的 *Bacillus* sp. 7NZ-3 进行单菌剂和复合菌剂的浸种处理和幼苗实验。施加 HNR-4 菌剂后, 镉在水稻幼苗根部的积累量较大, 而在茎叶部的积累量显著降低, 说明 HNR-4 菌剂可以减少重金

属离子向水稻地上部分的转移和积累。施加 7NZ-3 菌剂后, 水稻幼苗的根长、株高等都有显著提高, 促生效果更为明显。而施加 HNR-4 和 7NZ-3 混合菌剂, 镉在水稻根部和茎叶部的积累量均显著降低。因此, 复合菌剂似乎优于单菌剂, 但其在水稻中的定殖及互作关系有待于进一步解析。本课题组前期以一株具有较强镉耐受性和吸附性的 *Bacillus aryabhattai* T61 为实验材料, 证实 T61 菌株可在水稻幼苗根和茎上定殖, 并在大田实验中观察到 T61 菌剂可以缓解水稻植株遭受的镉胁迫, 降低水稻品种 728B 和内香 1B 籽粒中的镉含量<sup>[38]</sup>。此外, 其他一些研究也报道了 *Bacillus megaterium* H3 和 *Bacillus subtilis* 可以降低镉胁迫条件下水稻根、地上部分和种子中的镉含量, 促进水稻植株的生长<sup>[34–35]</sup>。但目前对于内生芽孢杆菌在水稻植株中的分布和迁移规律尚不明确, 因此尚需采用细胞显微成像、RT-qPCR、代谢组学等技术, 对内生菌在水稻植株各部分的定殖和丰度进行定性定量分析, 并进一步探讨菌株定殖与植物生长、胁迫响应和重金属积累的关系。

综上, 本研究表明镉污染的水稻种子中蕴含着丰富的内生细菌资源。分离和筛选具有较强镉耐受性和植物促生性的功能性内生细菌, 对于深入研究植物-微生物-重金属污染互作机制, 以及开发微生物菌剂用于农田重金属污染的治理具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Shade A, Jacques MA, Barret M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 15–22.
- [2] Nelson EB. The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 2018, 422(1/2): 7–34.
- [3] Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 2019, 221: 36–49.
- [4] Zhou JY, Li P, Meng DL, Gu YB, Zheng ZY, Yin HQ,

- Zhou QM, Li J. Isolation, characterization and inoculation of Cd tolerant rice endophytes and their impacts on rice under Cd contaminated environment. *Environmental Pollution*, 2020, 260: 113990.
- [5] Walitang DI, Kim CG, Kim K, Kang Y, Kim YK, Sa TM. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 51.
- [6] Walitang DI, Kim K, Madhaiyan M, Kim YK, Kang Y, Sa TM. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of rice. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 1–13.
- [7] 李南南, 黎妮, 赵燃, 袁隆平, 肖明, 刘洋, 王伟平. 优异杂交水稻亲本灌浆期种子内生细菌多样性研究. *微生物学杂志*, 2017, 37(2): 20–25.  
Li NN, Li N, Zhao R, Yuan LP, Xiao M, Liu Y, Wang WP. Diversity of endophytic bacterial communities in parental seeds of outstanding hybrid rice (*Oryza sativa* L.) in the milk. *Journal of Microbiology*, 2017, 37(2): 20–25. (in Chinese)
- [8] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 曹艳花, 唐雪, 张晓霞. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定. *微生物学报*, 2013, 53(3): 269–275.  
Jiang XY, Gao JS, Xu FH, Cao YH, Tang X, Zhang XX. Diversity of endophytic bacteria in rice seeds and their secretion of indole acetic acid. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(3): 269–275. (in Chinese)
- [9] 刘琳, 刘洋, 宋未. 杂交水稻种子固有细菌群落多样性探究. *生物技术通报*, 2009, 1: 95–99, 111.  
Liu L, Liu Y, Song W. Indigenous bacterial community diversity in hybrid rice (*Oryza sativa* L.) seed. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 1: 95–99, 111. (in Chinese)
- [10] 陈柯璇, 汤雯婷, 李丽娜, 李绍仕, 和丽萍, 李海燕. 种子内生菌增强宿主植物重金属抗性的功能机制研究进展. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 2187–2194.  
Chen KX, Tang WT, Li LN, Li SS, He LP, Li HY. Functional mechanism of seed endophytes enhancing heavy metal resistance of host plants: a review. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 2187–2194. (in Chinese)
- [11] Etesami H. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 147: 175–191.
- [12] 张凯璇, 唐艳葵, 秦芷怡, 黄以, 吴栋颢, 纳泽林, Thongsalak Saktikoun, 刘宇阳. 植物内生菌应用于有害金属污染环境修复研究进展. *江苏农业科学*, 2018, 46(6): 17–22.  
Zhang KX, Tang YK, Qin ZY, Huang Y, Wu DH, Na ZL, Saktikoun T, Liu YY. Research progress on application of plant endophytes in remediation of environmental pollution caused by harmful metals. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(6): 17–22. (in Chinese)
- [13] Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1562–1574.
- [14] Sessitsch A, Kuffner M, Kidd P, Vangronsveld J, Wenzel WW, Fallmann K, Puschenreiter M. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 60: 182–194.
- [15] Luo JP, Tao Q, Jupa R, Liu YK, Wu KR, Song YC, Li JX, Huang Y, Zou LY, Liang YC, Li TQ. Role of vertical transmission of shoot endophytes in root-associated microbiome assembly and heavy metal hyperaccumulation in *Sedum alfredii*. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(12): 6954–6963.
- [16] Wang L, Lin H, Dong YB, Li B, He YH. Effects of endophytes inoculation on rhizosphere and endosphere microecology of Indian mustard (*Brassica juncea*) grown in vanadium-contaminated soil and its enhancement on phytoremediation. *Chemosphere*, 2020, 240: 124891.
- [17] Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 2016, 174: 14–25.
- [18] 邓平香, 张馨, 龙新宪. 产酸内生菌荧光假单胞菌 R1 对东南景天生长和吸收、积累土壤中重金属锌镉的影响. *环境工程学报*, 2016, 10(9): 5245–5254.  
Deng PX, Zhang X, Long XX. Effects of acid producing endophytic bacteria *Pseudomonas fluorescens* R1 on the growth responses, Zn and Cd accumulation in *Sedum alfredii*. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(9): 5245–5254. (in Chinese)
- [19] Hu Y, Cheng HF, Tao S. The challenges and solutions for cadmium-contaminated rice in China: a critical review. *Environment International*, 2016, 92/93: 515–532.
- [20] Chen HP, Tang Z, Wang P, Zhao FJ. Geographical variations of cadmium and arsenic concentrations and arsenic speciation in Chinese rice. *Environmental Pollution*, 2018, 238: 482–490.
- [21] Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163–175.
- [22] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 793–796.
- [23] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for

- the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47–56.
- [24] 孙亚凯. 功能性微生物菌株的筛选及组合菌群活性研究. 天津大学学位论文, 2006.
- [25] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10–15.
- [26] Zhou WZ, Zhang HO, Ma YH, Zhou JP, Zhang YZ. Bio-removal of cadmium by growing deep-sea bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SCSE709-6. *Extremophiles*, 2013, 17(5): 723–731.
- [27] Montalbán B, Croes S, Weyens N, Lobo MC, Pérez-Sanz A, Vangronsveld J. Characterization of bacterial communities associated with *Brassica napus* L. growing on a Zn-contaminated soil and their effects on root growth. *International Journal of Phytoremediation*, 2016, 18(10): 985–993.
- [28] Sun WH, Xiong Z, Chu L, Li W, Soares MA, White JF Jr, Li HY. Bacterial communities of three plant species from Pb-Zn contaminated sites and plant-growth promotional benefits of endophytic *Microbacterium* sp. (strain BXGe71). *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 370: 225–231.
- [29] Syranidou E, Thijs S, Avramidou M, Weyens N, Venieri D, Pintelon I, Vangronsveld J, Kalogerakis N. Responses of the endophytic bacterial communities of *Juncus acutus* to pollution with metals, emerging organic pollutants and to bioaugmentation with indigenous strains. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1526.
- [30] Zadel U, Nesme J, Michalke B, Vestergaard G, Plaza GA, Schröder P, Radl V, Schlöter M. Changes induced by heavy metals in the plant-associated microbiome of *Miscanthus x giganteus*. *Science of the Total Environment*, 2020, 711: 134433.
- [31] Luo JP, Tao Q, Wu KR, Li JX, Qian J, Liang YC, Yang XE, Li TQ. Structural and functional variability in root-associated bacterial microbiomes of Cd/Zn hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(21): 7961–7976.
- [32] Lin XY, Mou RX, Cao ZY, Xu P, Wu XL, Zhu ZW, Chen MX. Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains. *Science of the Total Environment*, 2016, 569/570: 97–104.
- [33] Suksabye P, Pimthong A, Dhurakit P, Mekvichitsaeng P, Thiravetyan P. Effect of biochars and microorganisms on cadmium accumulation in rice grains grown in Cd-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(2): 962–973.
- [34] Treesubuntorn C, Dhurakit P, Khaksar G, Thiravetyan P. Effect of microorganisms on reducing cadmium uptake and toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(26): 25690–25701.
- [35] Li Y, Pang HD, He LY, Wang Q, Sheng XF. Cd immobilization and reduced tissue Cd accumulation of rice (*Oryza sativa* Wuyun-23) in the presence of heavy metal-resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 138: 56–63.
- [36] Ghosh A, Pramanik K, Bhattacharya S, Mondal S, Ghosh SK, Ghosh PK, Maiti TK. Abatement of arsenic-induced phytotoxic effects in rice seedlings by an arsenic-resistant *Pantoea dispersa* strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(17): 21633–21649.
- [37] Walitang DI, Kim CG, Jeon S, Kang Y, Sa TM. Conservation and transmission of seed bacterial endophytes across generations following crossbreeding and repeated inbreeding of rice at different geographic locations. *Microbiology Open*, 2019, 8(3): e00662.
- [38] 范美玉, 黎妮, 贾雨田, 张超, 王伟平, 杨志伟. 耐镉阿氏芽孢杆菌缓解水稻受镉胁迫的研究. 农业环境科学学报, 2021, 40(2): 279–286.
- [38] Fan MY, Li N, Jia YT, Zhang C, Wang WP, Yang ZW. Study on the mitigation of cadmium stress in rice by cadmium-resistant *Bacillus aryabhatai*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(2): 279–286. (in Chinese)
- [39] 余劲聪, 何舒雅, 曾润颖, 林克明. 芽孢杆菌修复土壤重金属镉污染的研究进展. 广东农业科学, 2016, 43(1): 73–78.
- [39] Yu JC, He SY, Zeng RY, Lin KM. Research progress in remediation of cadmium contaminated soil with *Bacillus*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016, 43(1): 73–78. (in Chinese)
- [40] Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(3): 142–149.
- [41] Sinha S, Mukherjee SK. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. *Current Microbiology*, 2008, 56(1): 55–60.
- [42] Chmielowska-Bąk J, Gzyl J, Rucińska-Sobkowiak R, Arasimowicz-Jelonek M, Deckert J. The new insights into cadmium sensing. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 245.
- [43] Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 2014, 169(1): 30–39.
- [44] Punjee P, Siripornadulsil W, Siripornadulsil S. Reduction of cadmium uptake in rice endophytically colonized with the cadmium-tolerant bacterium *Cupriavidus taiwanensis* KCU2500-3. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, 64(2): 131–145.
- [45] Siripornadulsil S, Siripornadulsil W. Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 94: 94–103.

(本文责编 张晓丽)