

矿区先锋植物根内生促生菌的高效分离与群落稳定构建

The Efficient Isolation of Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Pioneer Plants in Mining Areas and the Stable Construction of Microbial Communities

高寒冰, 何晓, 贾沃, 郭朝晖, 徐锐*

冶金与环境学院, 中南大学, 长沙, 湖南

*通讯作者邮箱: xurui7@csu.edu.cn

摘要

基于植物-微生物互作的生态修复技术是治理矿区土壤污染的重要方法, 鉴于先锋植物根际微生物因其在促进植物生长中的巨大潜力, 其微生物接种是一种维护植物健康生长与修复的重要方法。与商业化菌剂相比, 从根际原位分离的土著微生物在定植效果和功能表现上更为优越, 因此, 快速判断具有分选潜力的根际样品尤为重要。同时, 传统的菌株分离方法效率低下, 目前仍缺乏获取根际菌株的高效方法。此外, 单一菌株的定植效率和功能表现有限, 而合成菌群 (SynComs) 能够更好地发挥协同作用。因而本文提出了一种结合样品识别、高效分离、稳定合成及植物促生验证的实验方法, 用于矿区先锋植物根际微生物的快速分离与群落合成, 为矿区生态修复提供技术支持。

关键词: 重金属, 植物内生菌, 高效分离, 稳定合成, 功能验证

研究背景

在矿山生态修复过程中，植物面临金属胁迫和寡营养等挑战，导致生态修复效果不佳。而先锋植物微生物组通过固氮、溶磷和分泌铁载体等机制，促进植物生长和营养吸收，并通过螯合或转化金属，降低重金属毒性，增强植物耐受性[1]。因此，根际微生物接种已成为促进植物修复的重要方法[2]。尽管商业菌株的应用已相当普遍，但其在根际中的定植和功能发挥受到环境显著影响[3]，且由于缺乏对多样宿主的适应性，商业菌株的功效往往不够可靠，导致预期效果不佳[4]。而根系土著微生物更能适应当地环境，具有更好的定植效果和功能表现[5]。因此，快速筛选适宜分选的根本样品，并原位分离具有促生潜力的微生物至关重要。目前，常用传统平板划线分离方法分离目标功能菌株，但这种方法繁琐且周期长，分离效果差[6]。相比之下，通过极限稀释结合96孔培养板的分离能够显著提高分离效率，可以在短时间内获得大量纯种菌株，并结合基因测序，可快速获取微生物的遗传信息及代谢功能。考虑到单一微生物的功能有限难以适应复杂的环境，由单菌合成得到的低复杂性和高可控性的SynCom的研究也越来越受到关注[7]。例如，土著SynCom可通过多种植物促生机制有效提高植物的生产力和抵御胁迫的能力[8,9]。这些SynCom还能与原生土壤中的植物宿主共同进化，尤其是在矿区等营养有限的环境条件下，土著SynCom对土壤功能和植物发育具有持久的积极影响[10]。因此，如何选择功能互补且稳定的菌群成员并构建有效的SynCom成为当前研究的重点。基于此，本研究提出了一种用于识别、分离、高效合成矿区先锋植物根际促生菌群的方法。

主要流程

首先快速判断和筛选出具有分选潜力的先锋植物根际样品。随后，采用极限稀释结合96孔培养板的方法对这些样品中的根际微生物进行高效分离，并通过基因测序获取其遗传信息和代谢功能。最后，基于所筛选出的功能菌株，构建低复杂性且高可控性的合成菌群，并通过植物促生实验验证其在矿区生态修复中的潜力（图1）。

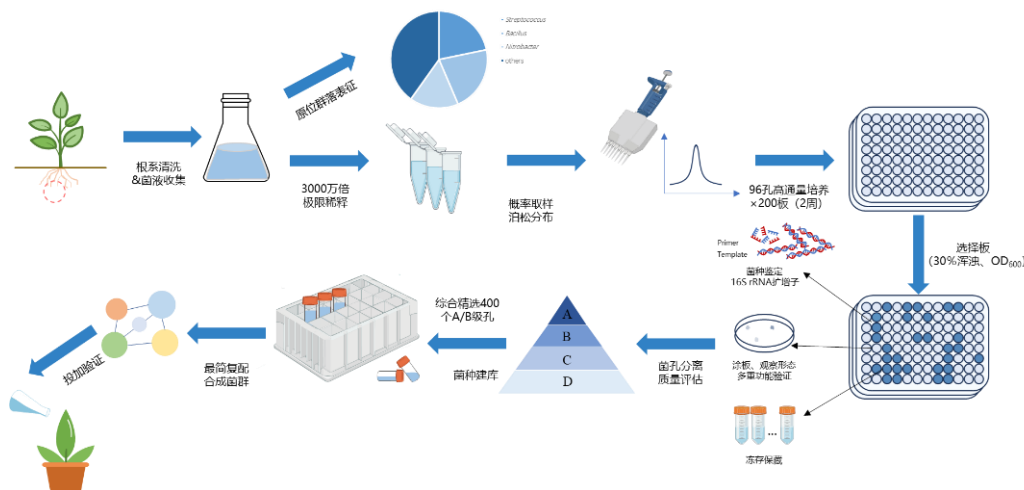


图 1. 本文工作流程示意图

材料与试剂

1. 移液器枪头
2. EP 管
3. 50 mL 离心管

引用格式：高寒冰，何晓，贾沃，郭朝晖，徐锐. (2024). 矿区先锋植物根内生促生菌的高效分离与群落稳定构建. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584.

How to cite: Gao, H. B., He, X., Jia, W., Guo, C. H. and Xu, R. (2024). The Efficient Isolation of Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Pioneer Plants in Mining Areas and the Stable Construction of Microbial Communities. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584. (in Chinese)

4. 96 孔细胞培养板（比克曼）
5. Parafilm 封口膜（比克曼）
6. 0.22 μm 无菌过滤膜（比克曼）
7. PCR 板（比克曼）
8. 营养土壤
9. 珍珠岩
10. 蛭石
11. 营养钵
12. 次氯酸钠（上海国药，分析纯）
13. 氯化镁（上海国药，分析纯）
14. 酒石酸锶钾（上海国药，分析纯）
15. 70%乙醇溶液
16. 琼脂粉（上海国药，分析纯）
17. 无菌去离子水
18. 磷酸缓冲液（biosharp）
19. FeCl_3 （上海国药，分析纯）
20. 浓 H_2SO_4 （上海国药，分析纯）
21. 吡啶乙酸（上海国药，分析纯）
22. 拟南芥（野生型 col-0）
23. 甘油（上海国药，分析纯）
24. 液氮
25. 大肠杆菌 DH5 α （Thermo Scientific）
26. Loading Buffer（Biosharp BL532A）
27. 碱裂解 Buffer I（25 mM NaOH and 0.2 mM Na₂—EDTA, pH = 12）（Biosharp BL532A）
28. 中和缓冲液 Buffer II（40 mM Tris-HCl, pH=7）（Biosharp BL532A）
29. 2.5%有效氯浓度的次氯酸钠溶液（见溶液配方）
30. 1/2 MS 固体培养基（见溶液配方）（比克曼）
31. 1/10 TSB 液体培养基（见溶液配方）（青岛海博）
32. LB 液体培养基（见溶液配方）
33. 无机磷培养基（见溶液配方）（青岛海博）
34. Ashby 无氮培养基（见溶液配方）（青岛海博）
35. CAS 培养基（见溶液配方）（青岛海博）
36. R₂A 固体培养基（见溶液配方）（青岛海博）
37. SV Gel and PCR Clean-up System 试剂盒
38. Quant-iTTM PicoGreenTM dsDNA Assay Kit 分析试剂盒
39. DNeasy Powersole 试剂盒（Qiagen, Dresden, 德国）

仪器设备

1. 生物安全柜/超净工作台（Thermo Fisher, 1300 Series A2）
2. 高压蒸汽灭菌锅（力辰, DGL-35G）
3. 可见分光光度计（北京普析, T400F）
4. 电子天平（力辰, LC-FA2004）
5. 高速离心机（Eppendorf, 5810r）
6. 八通道移液器（Thermo, Scientific）

引用格式: 高寒冰, 何晓, 贾沃, 郭朝晖, 徐锐. (2024). 矿区先锋植物根内生促生菌的高效分离与群落稳定构建. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584.

How to cite: Gao, H. B., He, X., Jia, W., Guo, C. H. and Xu, R. (2024). The Efficient Isolation of Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Pioneer Plants in Mining Areas and the Stable Construction of Microbial Communities. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584. (in Chinese)

7. 三角锥型瓶（蜀牛）
8. 微孔板离心机（迈克尔，MK-30）
9. 恒温培养摇床（一恒，THZ）
10. 超低温冰箱（Thermo, 906-Ults）
11. PCR 仪（Bio-Rad, CFX96）
12. 凝胶电泳仪（伯兰特，DYCP-31DN）

实验步骤

一、分选潜力样品的快速判别

1. 从矿区自然土壤中采集植物新鲜根系样品，使用冰袋运回实验室。为了保证样品中微生物的活性，样品应尽量在 4 小时内运达实验室进行下一步分析。采集先锋植物（如芒草）的新鲜根系样品约 10 g，首先用自来水将肉眼可见的土壤颗粒洗掉。接着将根系转移至新的 50 mL 离心管，管中加入 30 mL 磷酸缓冲液，在室温条件下，放置在平板摇床上用 180 rpm 的转速清洗 15 min，重复清洗 3 遍。最后，用无菌滤纸吸取根系残留液体。
2. 将根系研磨成匀浆。将清洗并吸水后的根系组织用无菌剪刀尽可能剪成小段，并混合均匀。称取 2 g 的根系组织放入 1.5 mL 的无菌离心管。在生物安全柜中，向离心管中加入 200 μ L 灭菌的 10 mM 的氯化镁溶液，用无菌研磨棒研磨根系直至成匀浆状，取混匀的根系组织用于检测根系微生物组。
3. DNA 提取和扩增
使用 DNeasy Powersole 试剂盒提取内生菌 DNA。将基因组 DNA 作为模板，扩增其 V5V7 高变区。以 799F 为正向引物，以 1193R 为反向引物进行 PCR 扩增；已知菌液大肠杆菌 DH5 α 为模板的阳性对照，灭菌去离子水为模板的阴性对照；PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，配制 1.2% 的琼脂糖凝胶，电压设置 120 V，电泳约 20–40 min。阳性对照目的条带位置正确，阴性对照无条带，表明 PCR 扩增合格。切取 16S rRNA 基因的 PCR 扩增片段（约 500 bp）以及该片段上下 2 mm 凝胶内的所有片段，然后将胶块装入 2 mL 无菌离心管，用 SV Gel and PCR Clean-up System 试剂盒进行切胶回收，得到各孔细菌的 16SrRNA 基因的 PCR 纯化样本。DNA 浓度由 Quant-iT TMPicoGreenTM dsDNA Assay Kit 分析试剂盒（Invitrogen 公司）测定，并以等量 DNA 的标准混合细菌 DNA 样本，得到测序鉴定文库。
4. 测序和生信分析：对鉴定文库在 Hiseq2500 平台上进行测序，得到根系细菌的非冗余序列，每个序列包含一个 barcode 和 16S rRNA 基因 V5-V7 序列。根据 barcode 对序列进行质量过滤和样本拆分，通过 UNOISE 算法，去除嵌合体和低丰度序列（读取计数<8）后定义 identity = 100% 的序列为 ASV。将培养细菌 16SrRNA 基因 V5-V7 序列与 Silva (<https://www.arb-silva.de/>) 数据库中的细菌 16S rRNA 基因的 V5-V7 序列进行比较，采用 SINTAX 算法对细菌 ASV 进行分类注释。对其进行 PICRUST2 基因预测，功能基因参考 KEGG 数据库，以植物促生相关功能基因为筛选阈值，具体可根据实验目的进行调整。
5. 当根际微生物群落的 PICRUST2 基因预测结果显示具有显著表达的与植物促生相关的功能基因（如 *ipdC*、*acrA*、*mbtH*、*nifH* 等）和与特定污染物抗性相关的基因（如 *aioA*、*arsA*、*czcD* 等）时，可判定该根系样品具有分选潜力，适合作为进一步分离与研究的候选样品。

推荐例：

砷/锑污染土壤：锑抗性相关基因 *aioA* (K08356)，*arsA* (K01551)，*arsB* (K03325)，*arsC* (K03741)。

镉污染土壤：*czcD* (K16264)，*zipB* (K16267)，*cmtR* (K21885)，*cadC* (K21903)

植物促生：*ipdC* (K04103)，*acrA* (K03585)，*mbtH* (K05375)，*nifH* (K02588)

二、根系微生物的高效分选与功能验证

1. 根系微生物高效分选（图 2）

- 重复上述根系分离步骤，将得到的根系匀浆液转至含有 25 mL 的 10 mM 氯化镁的 50 mL 管中，混匀，室温下静置 15 min。在生物安全柜中，例如将菌液按照 10 万倍，100 万倍，1,000 万倍，1 亿倍稀释倍数加入到含有 0.1 mM Sb^{3+} 的灭菌 10% TSB 溶液的 4 个瓶中。摇匀每瓶稀释液，将部分稀释液倒入无菌培养皿中，用排枪吸取液体移入 96 孔细胞培养板的每个孔中，每孔 160 μL ，每瓶稀释液转移 3 个细胞培养板，未添加根系匀浆的灭菌 10% TSB 溶液转移 3 个细胞培养板作为阴性对照。用 Parafilm 将每一个细胞培养板封口，反复仔细多刮表面多次。移液时应尽量避免液体溅到孔外，否则容易造成污染。避光一周后寻找与 30% 浑浊度最接近的稀释倍数作为最适稀释浓度（ODC），重新按照上述步骤研磨根系匀浆，并分别按 $1/3 \times \text{ODC}$ 、ODC 和 $3 \times \text{ODC}$ 稀释浓度用 0.1 mM Sb^{3+} 的 10% TSB 溶液配制稀释液。将稀释液转移至 96 孔板，放置在室温下孵育 2 周。二周后观察 96 孔细胞培养板中细菌的生长情况，保留约 30% 的孔呈现肉眼可见的浑浊状态的培养板。用微孔板离心机将板内液体离心至管底再揭开 PCR 封板膜以避免污染。用移液枪从培养板孔中吸取 20 μL 样品移入灭菌 EP 管中，存储在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后期细菌鉴定。每孔剩余样品中转移新的灭菌 EP 管并添加 140 μL 的 80% 灭菌甘油，使用液氮速冻后存储在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。
- 菌孔 DNA 的提取鉴定（本步骤也可以经后续功能鉴定后再选择所需目的菌孔进行鉴定）：采用碱解法提取培养细菌的 DNA。向 20 μL 样品移入灭菌 EP 管中加入 20 μL 碱性裂解液。将上述体系用排枪吹打混匀后用扣盖，在水浴锅（95 $^{\circ}\text{C}$ ，30min）裂解菌体。冷却降温后，向每孔中加入 20 μL 中和缓冲液，混匀并离心，存储于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。再参考上述步骤对 DNA 进行扩增和生信分析。
- 取 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存菌株在 LB 固体培养基中活化后，挑取单菌落转接至 20 mL LB 液体培养基中，置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 180 r/min 条件下的恒温培养摇床中过夜培养。将富集培养的菌液，使用可见分光光度计调整菌液浓度至 $\text{OD}_{600} = 0.5$ 后，用于下一步接种。

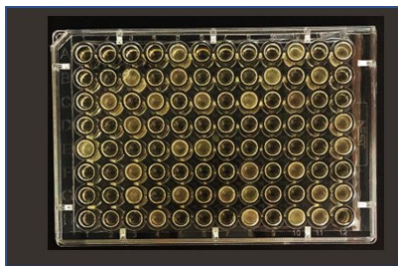


图 2. 菌群高效分离示意图

2. 菌群常见促生功能验证（根据目的选择）（图 3）：

- 溶磷功能研究：取 1 μL $\text{OD}_{600} = 0.5$ 的菌液接种于无机磷培养基上，每株重复 3 次，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d。观察有无溶磷圈产生，以接种 1 μL 的空白 LB 培养基为对照组。
- 固氮功能研究：取 1 μL $\text{OD}_{600} = 0.5$ 的菌液接种于 Ashby 无氮培养基 7 d，观察其生长情况和菌落周围是否出现透明圈，如出现透明圈则该菌株具有固氮能力，以接种 1 μL 的空白 LB 培养基为对照组。
- 产铁载体功能研究：取 1 μL $\text{OD}_{600} = 0.5$ 的菌液接种于 CAS 培养基，37 d，观察其生长情况，观察菌落周围是否出现黄色圈，如出现黄色圈则该菌株具有产铁载体功能，以接种 1 μL 的空白 LB 培养基为对照组。
- 产 IAA 功能定性测定：供试菌株接种于 100 mL LB 液体培养基（加入 0.5 g/L 色氨酸）。置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床，180 r/min 4 d。取菌悬液 10,000 r/min 离心 5 min，取上清液 1 mL 于 10 mL，同时加入 4 mL 比色液（30 mL 浓 H_2SO_4 ，1.5 mL 0.5 mol/L 比色液 FeCl_3 ，50 mL 蒸馏水），标准对照在比色液中加入 1 mL 50 mg/L 的吲哚乙酸标准品，空白对照加入 1 mL 培养基和 4 mL 比色液。所有 EP 管于

室温避光放置 30 min 后观察，颜色变红者表示能够分泌 IAA。

- e. 金属耐受测定：使用的培养基为 LB 液体培养基，加入重金属溶液（可根据需要设置浓度梯度），设置 3 个平行组以及 1 个空白对照（不接种菌），每组配制 250 mL 培养液，进行高温灭菌（121℃，20 min），在超净工作台上冷却至适宜温度后，接入 1% 的菌液，锥形瓶均放到 30 °C、150 rpm 的摇床中培养，实验持续 3 天。每间隔 12 或 24 小时用可见分光光度计测定其 OD₆₀₀ 并绘制生长曲线。
- f. 如所选重金属为变价金属（砷锑），可同步每间隔 12 或 24 小时测定一次氧化/还原情况，绘制氧化/还原曲线。曲线测定时，先将样品在 50,00 rpm 下离心 5 min，取上清液，使用原子荧光测定其中砷锑（III）的浓度，绘制浓度曲线。

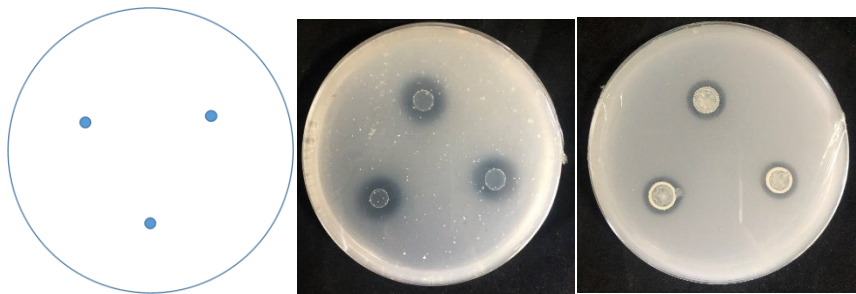


图 3. 功能验证示意图（溶磷，固氮为例）

三、生态稳态构建及植物促生功能验证

1. 菌株互作

- a. 平板对峙实验：使用可见光可见分光光度计测定菌液浓度，将浓度调节至 OD₆₀₀=0.5；吸取 7 次 1 μL 稀释液依次接种至 R2A 固体培养基的方形培养皿的两侧对角线，接种点间逐渐靠近呈现一个“V”型。封口膜密封后，20 °C 孵育 7 天，在垂直于“V”型的直线上观察菌落生长情况，并对菌落直径进行测量。选择互利共生的菌株构建合成菌群进行进一步实验。本方法用来探究挥发性物质对菌群的影响（图 4）。

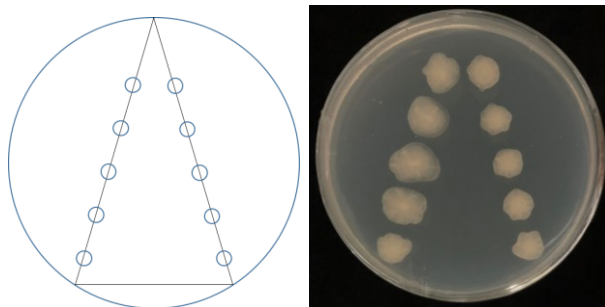


图 4. 平板对峙示意图

- b. 液体互作实验：将两种细菌分别接种到 20 毫升的 LB 培养基中，并在 37 °C、180 r/min 的条件下孵育 48 小时，直至达到稳定期。然后，将细菌培养液以 8,000 r/min 离心 10 分钟，收集上清液（SM），并通过 0.22 μm 的无菌滤膜过滤。将每种细菌的细菌悬液调整到相同的光密度（OD₆₀₀ = 0.1），确保细菌数量相同，并以 1% 的体积比接种到另一种细菌的 SM 中，在 37 °C 下孵育 48 小时。作为对照，将每种调整好的细菌悬液分别接种到新鲜的 LB 培养基中。孵育结束后，测量所有培养液的 OD₆₀₀ 值，表示细菌的生长量。结果表示为细菌在不同 SM 中的 OD₆₀₀ 值除以同一种细菌在新鲜 LB 培养基中的 OD₆₀₀ 值（即 OD₆₀₀ SM/新鲜）。本方法用来探究非挥发性代谢物质对菌群

的影响。

合成菌群的构建则根据以上结果进行综合判断，按照菌 $OD_{600}=0.5$ ，体积比为 1:1 的结果来进行构建。

2. 植物促生验证（图 5）

- 挑选一批籽粒饱满的野生型拟南芥种子，置于无菌的锥形瓶中，加入 75% 的酒精浸泡 5 min，然后用无菌水清洗 4 次；使用 2% NaClO 溶液浸润浸泡 10 min，期间不断摇晃，随后使用无菌水清洗 6 次，将种子表面的 NaClO 清洗干净。将拟南芥种子点在 1/2 MS 的隔板培养基上，置于 4 °C 的冰箱春化 48 h（以上步骤均在超净工作台中进行）。将无菌培养体系置于 25 °C，16 h 光照，25% 湿度的培养间内培养 7 d。将营养土壤、珍珠岩和蛭石按照体积比（3:1:1）混合均匀，在间隔 24 h 的高压 121°C 20 min 的灭菌条件下处理 3 次后烘干使用。将上述混合基质装入黑色营养钵后，取培养 7 天的拟南芥洗净根部残留培养基竖直放入基质中。置于 25 °C，16 h 光照，25% 湿度的培养间内培养 10 d（约 4 片真叶）后进行下一步处理。
- 将富集培养的菌液分别转移到 50 mL 的无菌离心管中，5,000 r/min、离心 10 min 后，于超净工作台中将其上清废弃；加入无菌水吸打均匀，置于上述离心条件再次离心，废弃上清（重复两次）；加入无菌水重悬，使用可见分光光度计调整菌液浓度至 $OD_{600}=0.5$ 后，按照菌液体积比基质重量为 1:100 的比例将菌液接种至营养钵内。若添加的微生物为混合菌群，将各成员按 1:1 等比例混合均匀后，再次测量并调整 OD_{600} 至 0.5，按比例添加至黑色营养钵内。可根据实验需要添加重金属，盐碱胁迫。继续置于 25 °C，16 h 光照，25% 湿度的培养间内培养。

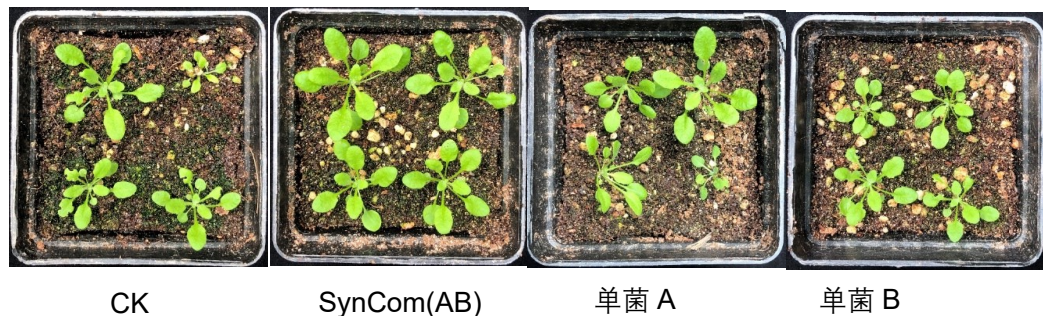


图 5. 合成菌群植物促生示意图

成功经验/失败经验

- 在含有胁迫的筛选培养基分选中，选择整体浑浊度低于 30% 的培养板。
- 可以利用 96 孔板进行所需功能筛选后测序，以减少非必要功能菌的获得。
- 合成菌群选择互利共生菌株（至少不拮抗），最好选择功能互补的菌株，能够充分利用生态位。

溶液配方

1. LB 液体培养基

蛋白胨 10 g；酵母粉 5 g；NaCl 8 g；蒸馏水 1,000 mL；pH7.0–7.2。

2. 1/10 TSB 液体培养基

胰酪胨 17.0 g；氯化钠 5.0 g；大豆木瓜蛋白酶水解物 3.0 g；磷酸氢二钾 2.5 g；葡萄糖 2.5 g；

3. 无菌去离子水

引用格式：高寒冰，何晓，贾沃，郭朝晖，徐锐. (2024). 矿区先锋植物根内生促生菌的高效分离与群落稳定构建. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584.

How to cite: Gao, H. B., He, X., Jia, W., Guo, C. H. and Xu, R. (2024). The Efficient Isolation of Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Pioneer Plants in Mining Areas and the Stable Construction of Microbial Communities. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584. (in Chinese)

去离子水经过 121 °C 高压灭菌 15 min。

4. 磷酸缓冲液
取磷酸二氢钾 0.68 g, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 29.1 mL, 用水稀释至 100 mL。
5. 无机磷培养基
葡萄糖 10.0 g; 硫酸铵 0.5 g; 酵母浸粉 0.5 g; 氯化钠 0.3 g; 氯化钾 0.3 g; 硫酸镁 0.3 g; 硫酸亚铁 0.03 g; 硫酸锰 0.03 g; 磷酸三钙 5.0 g; pH 值 7.0-7.5。
6. Ashby 无氮培养基
磷酸二氢钾 0.2 g; 硫酸镁 0.2 g; 氯化钠 0.2 g; 碳酸钙 5.0 g; 甘露醇 10.0 g; 硫酸钙 0.1 g; pH 值 7.0 ± 0.1。
7. CAS 培养基
铬天青 S (CAS) 60.5 mg; 十六烷基三甲基溴化铵 (HDTMA) 72.9 mg; 六水氯化铁 2.645 mg; 二水磷酸二氢钠 295.25 mg; 十二水磷酸氢二钠 1213.5 mg; 氯化铵 125 mg; 磷酸二氢钾 37.5 mg; 氯化钠 62.5 mg; 琼脂 9,000 mg; pH 值 6.8 ± 0.1。
8. 1/2 MS 培养基
Murashige Skoog 培养基 (含维生素) 干粉: 2.2 g; 蔗糖 10 g; 琼脂粉 8 g; pH 值 5.8。
9. 2.5%有效氯浓度的 NaClO 溶液
100 mL 无菌去离子水加上 3 mL NaClO。
10. 25 µL PCR 扩增体系
1 µL 模板 DNA、0.25 µL Fast pfu DNA 聚合酶、5 µL 5× PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)、2 µL dNTPs、1 µL 正向引物 799F 和 1 µL 反向引物 1193R、14.75 µL ddH₂O。
a. 799F: 5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3'
b. 1193R: 5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3'
灭菌要求: 121 °C 高压灭菌 15 min, 于超净台中分装, 在 4 °C 条件下可存储数周。
PCR 条件: DNA 在 98 °C 下初始变性 5 min, 随后 26 个循环, 每个循环在 98 °C 下变性 30 秒, 在 53 °C 下退火 30 s, 在 72 °C 下延伸 45 min, 最后在 72 °C 下终延伸 5 min, 降温到 16 °C 保存 PCR 产物。

致谢

感谢湖南省自然科学基金杰出青年项目 (2024JJ2072)、国家自然科学基金面上基金项目 (42377033)、中南大学研究生自主探索创新项目 (No. 2024ZZTS0321) 对本工作的大力支持。

参考文献

1. Singh, B. K., Trivedi, P., Egidi, E., Macdonald, C. A. and Delgado-Baquerizo, M. (2020). Crop microbiome and sustainable agriculture. *Nat Rev Microbiol.* 18(11): 601–602. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00446-y>
2. Sharma, P. (2021). Efficiency of bacteria and bacterial assisted phytoremediation of heavy metals: An update. *Bioresour Technol.* 328: 124835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124835>
3. Hartmann, M. and Six, J. (2022). Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nat. Rev. Earth Environ.* 4(1): 4–18. <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00366-w>
4. Kaminsky, L. M., Trexler, R. V., Malik, R. J., Hockett, K. L. and Bell, T. H. (2019). The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants. *Trends Biotechnol.* 37(2): 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.011>
5. Liu, C., Jiang, M., Yuan, M. M., Wang, E., Bai, Y., Crowther, T. W., Zhou, J., Ma, Z., Zhang, L., Wang, Y., et al. (2023). Root microbiota confers rice resistance to aluminium toxicity and phosphorus deficiency in

引用格式: 高寒冰, 何晓, 贾沃, 郭朝晖, 徐锐. (2024). 矿区先锋植物根内生促生菌的高效分离与群落稳定构建. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584.

How to cite: Gao, H. B., He, X., Jia, W., Guo, C. H. and Xu, R. (2024). The Efficient Isolation of Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Pioneer Plants in Mining Areas and the Stable Construction of Microbial Communities. *Bio-101* e2405584. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405584. (in Chinese)

- acidic soils. *Nat Food*. 4(10): 912–924. <https://doi.org/10.1038/s43016-023-00848-0>
6. Lee, D. J., Show, K. Y. and Wang, A. (2013). Unconventional approaches to isolation and enrichment of functional microbial consortium – A review. *Bioresour Technol*. 136: 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.075>
 7. Zhou, Y., Liu, D., Li, F., Dong, Y., Jin, Z., Liao, Y., Li, X., Peng, S., Delgado-Baquerizo, M., Li, X., et al. (2024). Superiority of native soil core microbiomes in supporting plant growth. *Nat Commun*. 15(1): 6599. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50685-3>
 8. Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X. and Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114(12): E2450–E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
 9. Qiao, Y., Wang, Z., Sun, H., Guo, H., Song, Y., Zhang, H., Ruan, Y., Xu, Q., Huang, Q., Shen, Q., et al. (2024). Synthetic community derived from grafted watermelon rhizosphere provides protection for ungrafted watermelon against *Fusarium oxysporum* via microbial synergistic effects. *Microbiome*. 12(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01814-z>
 10. de Souza, R. S. C., Armanhi, J. S. L., Damasceno, N. d. B., Imperial, J. and Arruda, P. (2019). Genome Sequences of a Plant Beneficial Synthetic Bacterial Community Reveal Genetic Features for Successful Plant Colonization. *Front Microbiol*. 10: e01779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01779>