

DOI: 10.11766/trxb202211230642

王东亚, 陈冠虹, 方利平, 李芳柏. 水稻根际芽孢杆菌抗砷胁迫作用及其微生物机制[J]. 土壤学报, 2024, 61(3): 783–793.

WANG Dongya, CHEN Guanhong, FANG Liping, LI Fangbai. Microbial Mechanisms of *Bacillus* Resistance to Arsenite in Rice Rhizosphere[J]. Acta Pedologica Sinica, 2024, 61(3): 783–793.

水稻根际芽孢杆菌抗砷胁迫作用及其微生物机制*

王东亚^{1, 2, 3, 4}, 陈冠虹^{2, 4}, 方利平^{2, 4}, 李芳柏^{2, 4†}

(1. 中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640; 2. 广东省科学院生态环境与土壤研究所, 广州 510650; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 华南土壤污染控制与修复国家地方联合工程研究中心, 广州 510650)

摘要: 砷甲基化过程作为微生物的砷抗性机制改变砷的毒性和移动性, 对土壤砷污染控制有重要意义。砷抗性根际促生菌对砷胁迫下水稻生长产生积极影响, 然而水稻根际菌的砷甲基化效率及其影响水稻砷胁迫的机制研究还较为缺乏。从砷污染稻田根际土中筛选出一株砷甲基化功能芽孢杆菌 *Bacillus* sp. LH14, 探究该菌株的砷甲基化效率、砷抗性和促生相关特性, 以及菌株接种对土壤砷形态、水稻生长和根际微生物相互作用的影响。结果表明, 菌株 LH14 具有砷甲基化和挥发能力, 34 h 内将三价无机砷转化为甲基砷的效率为 54.9%, 主要形态为二甲基砷和三甲基砷。LH14 接种显著提高了土壤中砷甲基转移酶基因 (*arsM*) 丰度, 增加土壤溶液甲基砷浓度, 表明 LH14 参与了土壤砷形态转化。LH14 能在砷胁迫下产生吲哚-3-乙酸 (IAA), 菌株浸染显著增加高砷条件下种子萌发率、根和芽长及生物量。接种 LH14 对砷污染土壤中水稻植株生长有促进作用, 可能与根际有益菌 (例如 *Burkholderiaceae* 和 *Gemmatimonadaceae*) 相对丰度增加有关。所以, 水稻根际存在砷甲基化功能植物促生菌, 接种该菌改变水稻根际砷形态, 并能产生植物激素和富集根际有益菌从而直接和间接地促进水稻生长, 有利于缓解水稻砷胁迫, 为砷甲基化功能菌应用于砷污染土壤修复和缓解植物砷胁迫提供理论支撑。

关键词: 砷胁迫; 砷甲基化; 芽孢杆菌; 水稻根际; 微生物互作

中图分类号: X53 文献标志码: A

Microbial Mechanisms of *Bacillus* Resistance to Arsenite in Rice Rhizosphere

WANG Dongya^{1, 2, 3, 4}, CHEN Guanhong^{2, 4}, FANG Liping^{2, 4}, LI Fangbai^{2, 4†}

(1. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. Institute of Eco-environmental and Soil Science, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. National-Regional Joint Engineering Research Center for Soil Pollution Control and Remediation in South China, Guangzhou 510650, China)

Abstract: 【Objective】 Microbial arsenic(As)methylation is a vital As resistance mechanism that alters the toxicity and mobility of As, and can be used for the control of As contamination in soils. As-resistant plant growth-promoting bacteria use this

* 国家自然科学基金项目 (42007292)、中国博士后科学基金资助项目 (2020M680116) 和广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项 (2019GDASYL-0102006, 2019GDASYL-0102002-3) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42007292), the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2020M680116), and the GDAS' Project of Science and Technology Development (Nos. 2019GDASYL-0102006, 2019GDASYL-0102002-3)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cefbli@soil.gd.cn

作者简介: 王东亚 (1998—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤砷污染控制。E-mail: 18324707985@163.com

收稿日期: 2022–11–23; 收到修改稿日期: 2023–02–14; 网络首发日期 (www.cnki.net): 2023–05–30

mechanism to positively affect the growth of rice in As-contaminated soil. However, the arsenic methylation efficiency of rice rhizosphere bacteria and its effect on rice growth under arsenic stress remain unclear. 【Method】 In this study, an As-methylating functional *Bacillus* sp. LH14 was isolated from rice rhizosphere soil contaminated with As. The As methylation efficiency, As resistance and plant growth-promoting traits of the strain were analyzed. Additionally, the effect of strain inoculation on rice growth, rhizosphere As species and microbial interactions in As-contaminated soil were explored. 【Result】 The results show that strain LH14 promoted As methylation and volatilization and produced dimethylarsenate and trimethylarsenic oxide, which accounted for 54.9% of the initial As() in the medium. LH14 inoculation significantly increased the copy numbers of arsenic methyltransferase gene (*arsM*) and methylated As in rhizosphere soil, indicating that LH14 was involved in soil As transformation. LH14 produced IAA under As stress and significantly increased seed germination rate, root and shoot length and biomass in the presence of high As concentration. Also rice growth in the soil was significantly promoted by LH14 inoculation, and this was associated with the enrichment of beneficial microorganisms (e.g., *Burkholderiaceae* and *Gemmatimonadaceae*) in the rhizosphere. 【Conclusion】 Inoculation with As-methylating plant growth-promoting bacteria altered As speciation in rice rhizosphere and directly or indirectly promoted rice growth by producing plant hormones, enriching beneficial bacteria, and alleviating As stress. These findings provide theoretical support for the application of As-methylating bacteria in the remediation of As-contaminated soil and alleviation of As stress in plants.

Key words: As stress; As methylation; *Bacillus*; Rice rhizosphere; Microbial interactions

砷作为有毒类金属元素在自然和人为活动影响下释放到土壤环境中, 土壤累积的砷可通过植物吸收进入食物链^[1]。与其他农作物相比, 水稻在淹水条件下更容易积累砷^[2]。在淹水条件的稻田土壤中无机砷发生还原释放, 使得三价砷(As(III))成为土壤溶液中的主要砷形态^[3]。应对还原条件下高浓度砷, 微生物细胞能进行胞内As(III)外排, 或者As(III)甲基化。在砷甲基化微生物胞内, As(III)与谷胱甘肽形成复合物后, 以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体在砷甲基转移酶(arsenic methyltransferase, *ArsM*)催化下进行逐步甲基化, 生成一甲基亚砷酸(MMAs(III))、二甲基亚砷酸(DMAs(III))中间产物, 进而生成挥发性三甲基砷(TMAs(III)), 这些产物可在有氧条件下被快速氧化为五价甲基砷, 即一甲基砷(MMAs)、二甲基砷(DMAs)和三甲基砷氧化物(TMAsO)^[4]。砷甲基转移酶基因*arsM*是砷抗性基因家族的成员, 异源表达*arsM*赋予砷敏感大肠杆菌对As(III)的耐受性, 表明*arsM*是微生物进化出的重要砷抗性机制^[5]。砷甲基化将高毒三价砷转化为低毒的五价甲基砷和产生挥发性砷排出胞外, 实现微生物对砷的解毒^[6]。稻田中微生物砷甲基化过程改变As(III)的毒性和有效性, 所以调控微生物砷甲基化对指导砷污染稻田土壤修复具有重要意义。

砷甲基化微生物在稻田土壤中呈现高度物种多

样性, 且已经有多株好氧砷甲基化菌被分离鉴定。嗜纤维菌科的好氧砷甲基化细菌 *Cytophagaceae*. SM-1 分离自浅水层稻田土壤, 此种菌能在 24 h 内将 As(III) 几乎全部转化为 DMAs、TMAsO 和挥发性 TMAs(III), 接种 *Cytophagaceae*. SM-1 能明显促进水稻土中甲基砷和挥发性砷的产生^[7]。水稻根际筛出的好氧链霉菌属 *Streptomyces* sp. strain GSRB54 被验证具有砷甲基化能力, 主要甲基砷产物为 DMAs 和 TMAsO^[8]。此外, 假单胞菌产碱杆菌属 *Pseudomonas alcaligenes* NBRC14159 和芽孢杆菌 *Bacillus* sp. CX-1 能将 As(III) 转化为甲基砷, 产物主要为 DMAs^[9-10]。已有研究构建 *arsM* 功能 *Pseudomonas putida* KT2440, 砷甲基化主要产物为 DMAs, 能产生挥发性砷^[11]。携带 *arsM* 的基因工程菌 *Sphingomonas desiccabilis* 和 *Bacillus idriensis* 被用于促进砷污染土壤砷的挥发^[12]。将重组的 *arsM* 功能菌 *Rhizobium leguminosarum* 与红花苜蓿共生, 赋予根瘤菌-植物共生体系砷甲基化能力, 具有修复砷污染土壤的潜力^[13]。

芽孢杆菌属(*Bacillus*)是土壤中常见的优势微生物类群之一, 已有研究报道了具有砷抗性的芽孢杆菌属成员能发挥植物促生的功能, 对砷污染土壤中水稻植株生长有积极影响^[14]。砷污染农用地土壤中分离的砷抗性 *Bacillus aryabhatai* AS6 展现出产吲哚-3-乙酸(IAA)、铁载体、1-氨基环丙烷-1-羧酸

(ACC) 脱氨酶和溶磷的活性, 接种 AS6 后能减少砷污染下的水稻植株毒性, 对水稻苗生长有促进作用^[15]。接种砷抗性芽孢杆菌 AsSP9 能减少水稻砷毒性, 增加水稻发芽率、相对根长、淀粉酶和蛋白酶活性和生物量^[16]。水稻根际土中分离的具砷抗性和砷氧化功能的芽孢杆菌 *Bacillus flexus* ASO-6 能氧化 As(III) 为 As(V), 降低砷的毒性, 同时具有产 IAA 和溶磷等能力, 接种至水稻后显著增加砷污染下水稻种子萌发和植株叶绿素^[17]。此外, *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 通过溶解硅增加硅的有效性, 减少水稻砷的累积, 改善水稻的生长情况^[18]。砷抗性芽孢杆菌除了直接作用于水稻促进植株生长外, 还能改变水稻根际微生物菌群来影响水稻生长。例如 *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 (SN13) 接种后相对富集了有益的根际微生物, 协同帮助水稻在高盐条件下的健康生长^[19]。*Bacillus megaterium* 接种至水稻根际能提高植物有益菌的丰度, 对水稻系统抗性和生长有积极影响^[20]。然而, 应用砷甲基化功能芽孢杆菌对水稻砷胁迫的影响尚不清楚。

砷甲基化功能菌 *Streptomyces* sp. strain GSRB54 能增加水培体系下水稻根际甲基砷浓度^[8]。还有研究接种携带 *arsM* 基因的 *Pseudomonas oleovorans* B4.10 增加土壤酶活和根际矿质元素转化, 缓解水稻植株砷胁迫^[21]。但水稻根际菌的砷甲基化能力和其影响砷胁迫下水稻生长的作用机制的研究还较为缺乏。本研究从砷污染稻田根际土中筛选出一株砷甲基化功能芽孢杆菌 *Bacillus* sp. LH14, 探究了该菌株的砷甲基化效率和砷抗性以及促生相关特性, 然后在砷污染土壤中水稻根际接种 LH14, 探究其影响下的根际砷形态转化和根际微生物相互作用, 以期砷甲基化功能菌应用于砷污染土壤修复和缓解植物砷胁迫提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

LB 培养基配制 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10; R₂A 培养基配制 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 胰蛋白胨 0.25, 酸水解酪蛋白 0.5, 酵母提取物 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; ST 培养基配制 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 蛋白胨 5, 酵母提取物 0.5, 葡萄糖 5。

12 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO₂ 溶液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用; Salkowski 比色液按照每份 1.5 mL 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeCl₃、30 mL 98% H₂SO₄、50 mL H₂O 的比例配置; 土壤 DNA 提取使用 DNeasy PowerSoil Kit 试剂盒 (QIAGEN)。

供试土壤来自广东省汕头莲花山砷污染稻田, 总砷含量为 126 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 土壤风干后筛分至 < 2 mm 备用。供试植物为水稻, 水稻品种为黄华占。

1.2 砷甲基化菌的分离和鉴定

称取 2 g 水稻根际土壤加入 100 mL 1/10ST 培养基中, 在 30℃ 摇床 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 3 d。将培养物进行梯度稀释 ($10^3\sim 10^7$) 后, 涂布于含 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) R₂A 固体培养基上, 在 30℃ 培养箱中培养 2 d。从平板上挑选不同形态的单菌落接种到含 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 的 R₂A 液体培养基中, 在 30℃ 下摇床 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 3 d, 然后样品经 0.22 μm 滤头过滤, 用 NexION 300X 高效液相色谱-电感耦合等离子体-质谱仪 (HPLC-ICP-MS, PerkinElmer, USA) 对甲基砷进行定性定量测试, 测试目标物包括 MMAs(III)、MMAs(V)、DMAs(V) 和 TMAOs(V)。一株能将 As(III) 转化为 TMAOs(V) 和 DMAs(V) 的菌株 (LH14) 被分离, 并经三次纯化后获得纯菌株, 并于 30% 甘油中 -80℃ 保藏备用。

对菌株 LH14 的 16S rRNA 基因用 27F/1492R 引物扩增, 对 16S rRNA 基因全长 TA 克隆后, 由上海生工生物进行测序。将获得的基因序列 (1387 bp) 用 Blast 进行核苷酸同源性分析, 确定菌株 LH14 与酸速生芽孢杆菌 *Bacillus acidiceris* 同源性达 99.93%。菌株 LH14 全基因组序列由派森诺进行测定, 序列数据上传至 NCBI (登录号 NZ_CP096034.1)。利用 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline 进行基因功能注释, 鉴定出砷甲基转移功能基因 *arsM* (locus tag: MY490_10085), 蛋白长度为 264 个氨基酸。将 LH14 与其他 *Bacillus* 属 ArsM 同源蛋白序列在 MEGA7.0 中构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 用 bootstrap 自举分析重复检验 1 000 次检验系统发育树置信度。

1.3 菌株的 As(III) 甲基化能力和砷抗性测定

将对数生长期菌接种进含 12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III)

的 LB 培养基,使反应起始 OD_{600} 为 0.01, 30℃ 下摇床 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 34 h, 设置 6 个取样, 样品经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤头过滤后, 用 HPLC-ICP-MS 测定砷形态。培养结束后将顶空气体用硝酸银 (10%) 浸泡过的硅胶粒进行收集, HNO_3 (1%) 于 90℃ 2 h 洗脱后, 用上述方法测定砷形态。为测定该菌株的砷抗性, 在 0、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 的 LB 培养基中接种菌株 ($OD_{600} = 0.01$), 于摇床培养 40 h, 每 4 h 测定 OD 值, 每个处理 3 个重复。

1.4 IAA 测定和水稻种子萌发实验

接种菌株于有无 L-色氨酸 ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的含 0、5、12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) LB 液体培养基中, 培养 13 h 后取菌液用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤头过滤, 溶液用 Salkowski 进行显色, 于 530 nm 波长处测定吸光值。

水稻种子在 30% 过氧化氢表面消毒并用去离子水洗净后, 将种子浸泡于菌液 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 重悬后使 OD_{600} 为 1) 中 30 min (LH14), 并用 MgCl_2 溶液浸泡种子作为不接种对照处理 (CK)。将种子 (25 粒) 放置于培养皿中滤纸上, 加入 12 mL 0、15、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 溶液, 25℃ 避光培养 5 d, 测量水稻根长芽长及鲜重干重。

1.5 水稻盆栽实验

用 5 L 实验盆装入 3.5 kg 砷污染稻田土, 加入去离子水使得表面水层高 2 cm, 将育苗 15 d 后的水稻苗移栽到盆中, 每盆 6 株。设置水稻根部有无接种共 3 个处理, 分别为加入 10 mL 去离子水 (CK)、

10 mL OD_{600} 1.0 菌液 (LH14) 和重复 4 次并每次间隔一周接种 10 mL OD_{600} 1.0 菌液 (LH14R), 每个处理 4 个重复。在水稻生长的 0、8、14、20 和 26 d 用土壤孔隙水取样器连接真空玻璃管对根际土壤溶液进行取样 (约 5 mL), 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤头过滤后测定砷形态。在第 8 天和第 26 天, 将水稻苗从盆栽中取出, 用超纯水冲洗水稻根部, 采集根表 0~2 mm 的土壤样品, 液氮速冻 30 min 后 -80℃ 保存, 待提取 DNA。26 d 后测量所有处理中的水稻株高。

1.6 荧光定量 PCR 和 16S rRNA 基因高通量测序

用 QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit 试剂盒对 18 个土壤样品进行 DNA 提取, 然后用 Nanodrop 测定浓度和纯度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质鉴。16S rRNA 和 *arsM* 基因绝对定量的 PCR 反应体系为 10 μL , 包括 TB Green Premix Ex Taq II 5 μL 、上下游引物各 0.4 μL ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、DNA 模板 1 μL 、ddH₂O 3.6 μL 。所用引物 515F/806R 和 *arsMF1/arsMR2* 和 qPCR 扩增条件见表 1。用 pUC19 质粒载体构建相应基因的质粒标准曲线 ($10^2 \sim 10^8$ copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。使用 CFX 384 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) 进行扩增, 每个样品三个重复, 扩增过程中包括阴性对照, 反应效率为 90%~100%, 决定系数 (R^2) > 0.99。用带接头和 barcode 的引物 515F/806R 对 16S rRNA V4 区进行扩增, 建库后使用 Illumina MiSeq PE300 测序仪进行双端测序。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列及反应条件

Table 1 Details of primer pairs and thermal cycling parameters for qPCR

目的基因	引物	引物序列	长度	扩增条件
Target gene	Primer	Primer sequence	Length/bp	Amplification condition
16S rRNA	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	~300	95℃ 预变性 15 min; 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 43 个循环; 72℃ 7 min
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
<i>arsM</i>	<i>arsMF1</i>	TCYCTCGGCTGCGCAAYCCVAC	~350	95℃ 预变性 10 min; 95℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 39 个循环; 72℃ 10 min
	<i>arsMR2</i>	CGWCCGCCWGGCTTWAGYACCCG		

1.7 数据分析与统计

高通量测序产生每个样本最少 131 343 条序列量, 原始序列经过质控和拼接, 去冗余后进行聚类 and 去噪, 生成 amplicon sequence variant (ASV) 特征表。18 个样本共获得 13 352 个 ASV, 使用 SILVA

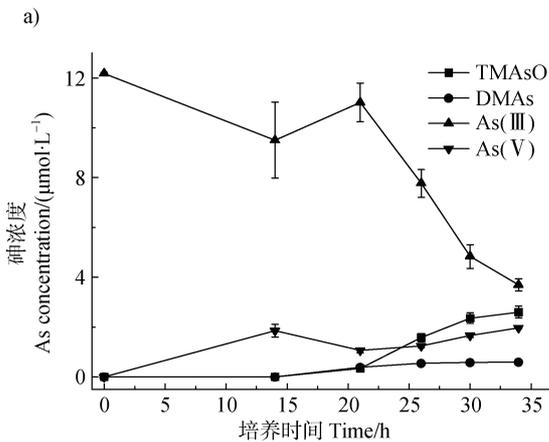
v132 数据库对 ASV 进行物种注释。为比较各处理间物种丰度的差异, 对科水平下物种相对丰度进行 Z-score 归一化, 即 $Z\text{-score} = (x - \mu) / \sigma$, 其中 x 、 μ 和 σ 分别为单个物种相对丰度值、均值和标准差。通过微生物分子生态网络方法 (pMEN) 分析各个

处理中 ASV 水平的共出现网络图,并在属水平上分析与 *Bacillus* 属相关联的物种共出现网络,然后用 Gephi 软件进行可视化。利用 SPSS 26 软件进行方差分析,检验处理间差异的显著性。

2 结果

2.1 *Bacillus* sp. LH14 砷转化效率和砷抗性

菌株 LH14 在含 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 培养基中培养 34 h 内,甲基砷浓度随时间逐渐增加,主要形态为 TMAOs 和 DMAs,未检出 MMAs (图 1a)。34 h 后,



TMAOs 和 DMAs 浓度分别达 2.6 和 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 甲基砷转化率 26.1%。培养基顶空也被发现有甲基砷 TMAOs (III) 气体产生,浓度为 $3.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 占总砷的 28.8%。培养结束时 As (III) 浓度下降至 $3.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 有 As (V) 生成 ($2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。表明 *Bacillus* sp. LH14 具有砷甲基化能力,将 As (III) 主要转化为溶解态 TMAOs 和 TMAOs (III) 气体。菌株 LH14 砷抗性实验结果表明,砷存在对 LH14 生长产生抑制作用,在 $5 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 浓度范围内菌进入对数生长期的时间延长,40 h 后有砷处理下 OD_{600} 值相比空白对照有所下降 (图 1b)。

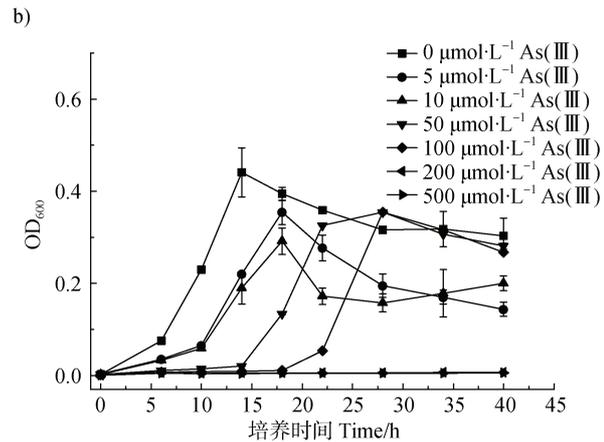


图 1 菌株 LH14 在含 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 培养基中培养 34 h 内不同形态砷浓度 (a) 及不同 As (III) 浓度下 LH14 生长曲线 (b)

Fig. 1 As speciation in LB medium inoculated with *Bacillus* sp. LH14 under $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) (a), growth curves (OD_{600}) of *Bacillus* sp. LH14 under different As (III) concentrations (b)

2.2 砷甲基转移蛋白系统发育树

菌株 LH14 全基因鉴定出一个 *arsM* 同源基因,该 *arsM* 基因位于 As (III) 结合型转录阻遏蛋白 *arsR* 下游,在距 *arsR* 长约为 6 kb 的间隔中包含 7 个基因,其中包括胞内解毒型砷还原基因 *arsC*、s 砷代谢转录调节蛋白 *arsD* 和砷泵 ATP 酶基因 *arsA*。*arsM* 基因对应蛋白质序列含 264 个氨基酸,与其他芽孢杆菌属物种 ArsM 蛋白序列一致性分别为 *Bacillus cereus* (70.8%)、*Bacillus thuringiensis* (70.8%)、*Bacillus caldolyticus* (62.6%)、*Bacillus* sp. CX-1 (31.6%) 和 *Bacillus pseudomycooides* (33.3%)。ArsM 蛋白序列系统发育树表明,菌株 LH14 的 *arsM* 基因与 *Bacillus cereus* 和 *Bacillus thuringiensis* 的进化关系较为接近 (图 2)。

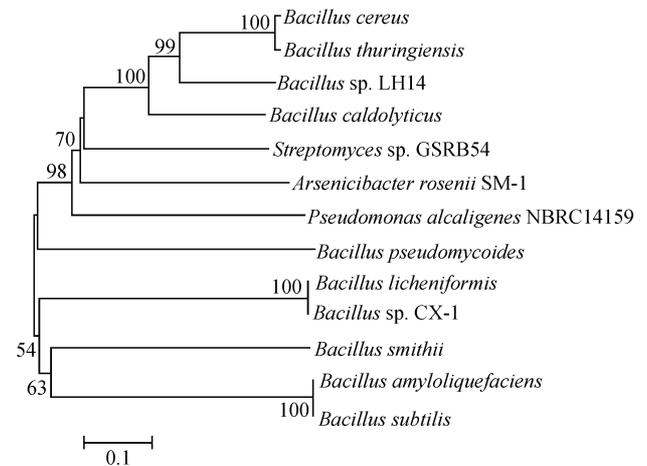


图 2 基于 ArsM 蛋白序列构建的 Neighbor-Joining 系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of ArsM retrieved from *Bacillus* sp. LH14 and reference protein sequences of ArsM retrieved from GenBank

2.3 砷胁迫下菌株 LH14 的 IAA 产量和对水稻种子萌发的影响

促生特性试验表明菌株 LH14 在所有处理下均有产 IAA 的能力, 如表 2 所示, 在色氨酸 (IAA 合成前体物) 存在条件下 IAA 产量高于无色氨酸处理。As (III) 存在显著抑制了 IAA 产生, 在 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 条件下分别降低了约 54% 和 89%。在不同砷浓度下, 接种 LH14 后的种子萌发率为 60%~88%, 高于无接种的处理 (38%~76%)。接种对有无砷条件下均能显著增加水稻芽长和根长, 对芽和根的鲜重和干重也有促进作用。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 浓度下相比无接种处理, 接种后芽长和根长分别增加 34.7% 和 232% (图 3a 和 3d), 芽鲜重增加 28.7% 而干重变化不明显 (图 3b 和图 3c), 根鲜重和干重分别增加 165% 和 275% (图 3e 和图 3f), 这些结果表明菌株 LH14 有助于缓解水稻砷胁迫, 促进植株生长。

2.4 菌株 LH14 对砷污染土壤中水稻生长和根际砷形态的影响

在土壤-水稻体系中水稻根际单次接种 (LH14)

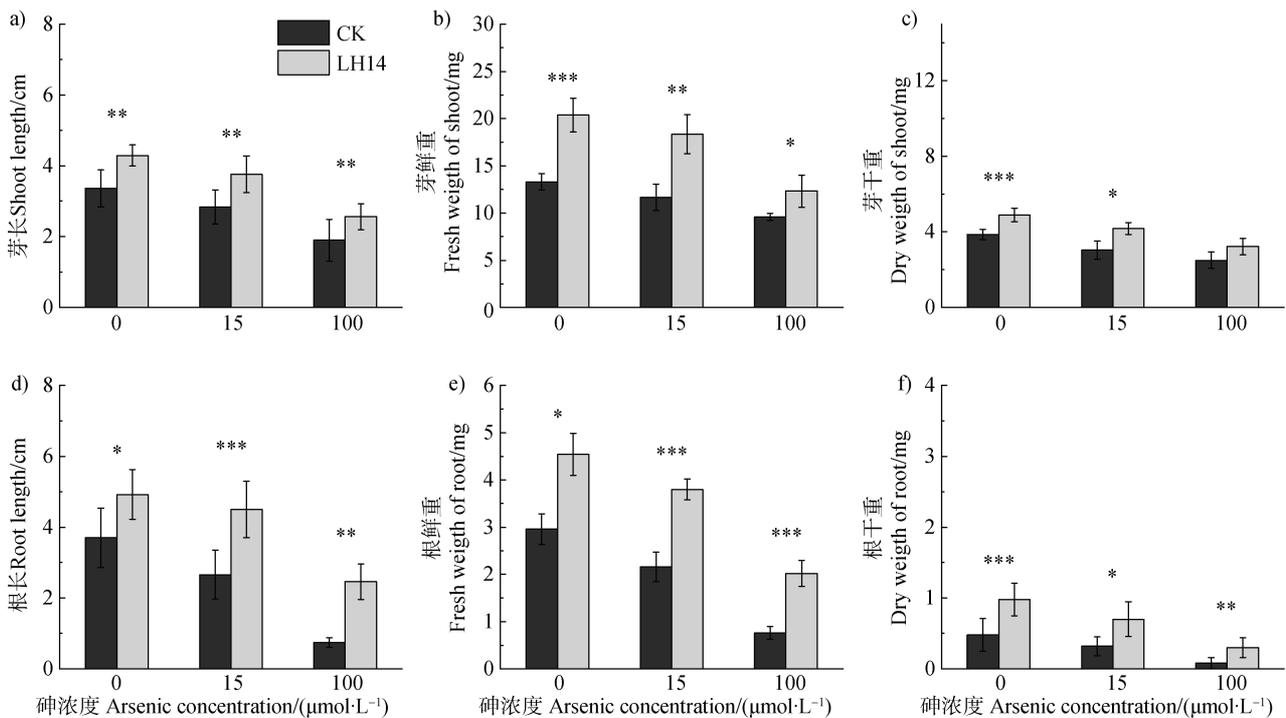
表 2 在 0 、 5 和 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 浓度下菌株 LH14 的 IAA 产量

Table 2 IAA production of LH14 at 0 , 5 and $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) concentrations

处理 Treatment	IAA 产量 IAA production / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	$0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III)	$5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III)	$12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III)
-Trp	$2.40\pm 0.14\text{aA}$	$0.97\pm 0.08\text{bB}$	$0.26\pm 0.03\text{cA}$
+Trp	$2.94\pm 0.17\text{aA}$	$1.54\pm 0.32\text{bA}$	$0.32\pm 0.001\text{cA}$

注: 不同小写字母表示不同砷浓度处理组差异显著, 不同大写字母表示有无色氨酸处理组差异显著 ($P < 0.05$)。Note: Different lowercase or uppercase letter means significant differences ($P < 0.05$) with different As treatments or with tryptophan treatments.

和多次接种 (LH14R) 处理均显著增加了水稻株高, 分别提高 38.3% 和 45.6% (图 4a), 显示出 LH14 对砷污染土壤中水稻生长的促进作用。在 26 d 培养期内水稻根际土壤溶液中 As (III) 浓度约为 $350 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CK 处理中根际甲基砷浓度为 $9.5\sim 11.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LH14 和 LH14R 处理 8 d 后甲基砷浓度分别增至 34.7 和 $32.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 提高 2.6 倍和 2.5 倍,

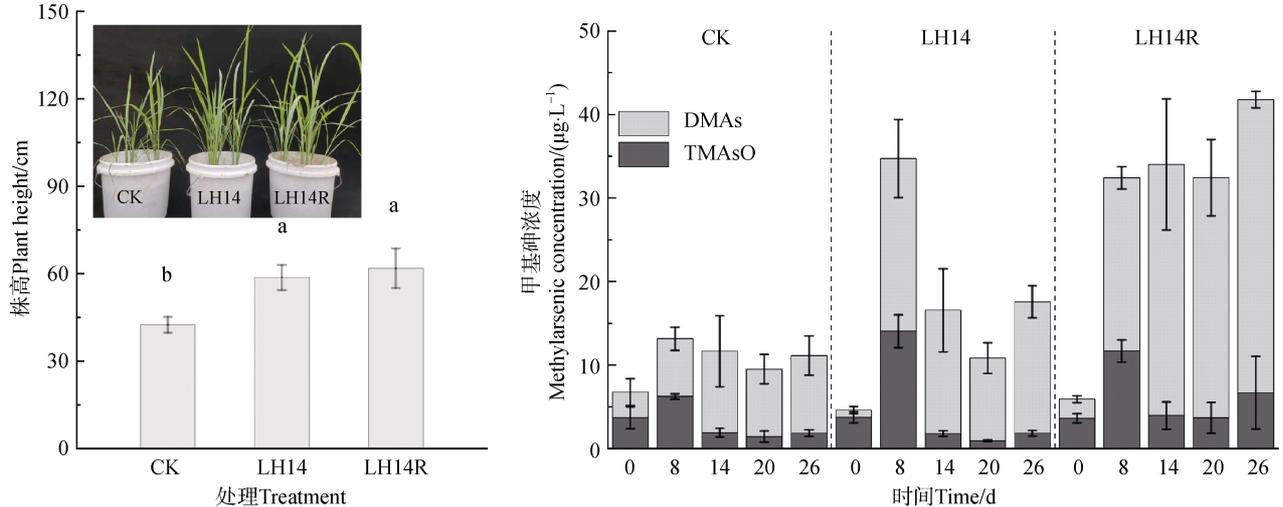


注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。note: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$, *** means $P < 0.001$ 。

图 3 在 0 、 15 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 浓度下有无接种 LH14 影响下的水稻幼苗生长

Fig. 3 The growth of rice seedling inoculated with or without LH14 responding to 0 , 15 and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III), respectively

形态主要为二甲基砷(图 4b)。第 8 天后, LH14 处理中根际甲基砷浓度有所下降, 而 LH14R 处理甲基砷始终保持较高浓度, 在培养最后 LH14 和 LH14R 处理的甲基砷较 CK 分别高 1.6 倍和 3.8 倍。



注: 不同小写字母表示不同处理组水稻株高差异显著 ($P < 0.05$)。Note: The different lowercase letter means significant difference in rice plant height with different treatments ($P < 0.05$).

图 4 有无接种 LH14 影响下的砷污染土壤中水稻株高 (a) 及根际土壤溶液甲基砷浓度 (b)

Fig. 4 Rice plant height (a) and methylarsenic concentration in rhizosphere soil solution (b) in arsenic-contaminated soil treated with or without the strain LH14

2.5 菌株 LH14 对砷污染土壤中水稻根际微生物群落的影响

LH14 和 LH14R 处理相比 CK 对 26 d 后水稻根际细菌 16S rRNA 基因丰度无显著影响(图 5a)。LH14 处理虽然在第 8 天对水稻根际 *arsM* 基因丰度无显著影响, 但第 26 天时 *arsM* 基因显著高于 CK(图 5b)。LH14R 处理在第 8 天和第 26 天均显著提高根际 *arsM* 基因丰度。水稻根际微生物菌群组成结果表明, *Betaproteobacteriales*、*Bacillales*、*Myxococcales*、*Clostridiales* 和 *Gemmatimonadales* 为所有处理中的主要根际细菌物种, 它们的相对丰度占到总细菌菌群的 31.6%~34.7% (图 5c)。相比 CK 中 *Bacillales* 相对丰度 (6.3%), LH14 和 LH14R 处理中其丰度增加至 8.0% 和 8.9%。科水平下相对丰度 Top 20 的物种组成聚类分析结果表明, LH14 与 CK 处理中芽孢杆菌科 *Bacillaceae* 相对丰度皆为 3.6%, 在 LH14R 处理中增至 4.1% (图 5d)。相较于 CK 处理, LH14 处理增加了 *Nitrosomonadaceae* 和 *Nocardioideaceae* 的相对丰度, 而 LH14R 处理对 *Burkholderiaceae* 和

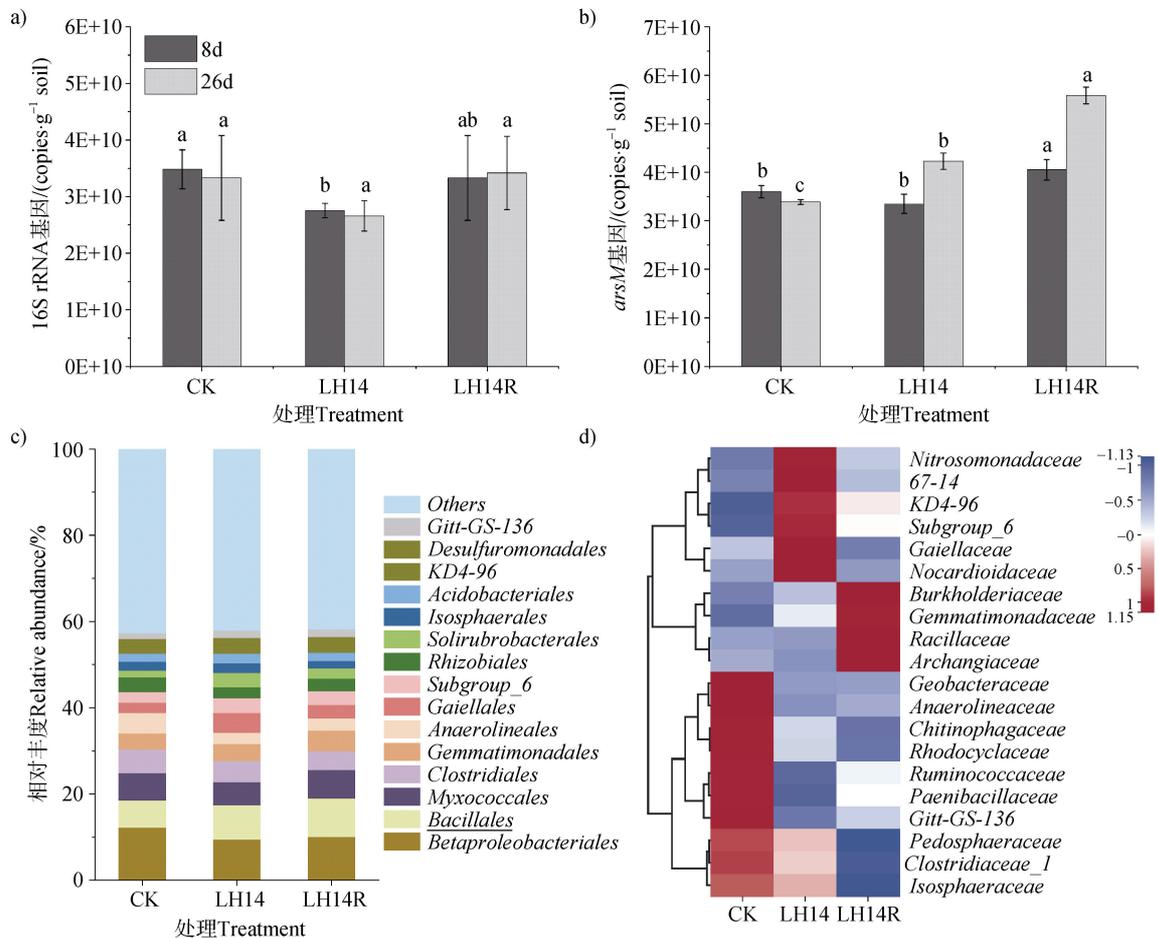
以上结果表明 LH14 有助于砷污染条件下的水稻生长, 同时转化水稻根际土壤溶液中 As (III) 为甲基砷, 且多次接种能够在水稻根际保持较稳定的甲基砷产生量。

Gemmatimonadaceae 有富集作用。

2.6 LH14 影响下的水稻根际微生物互作网络

水稻根际细菌 ASV 互作网络图拓扑性质结果显示 (图 6a), 对照、单次和多次接种处理的总节点数分别为 495、498 和 426, 总边数分别为 784、814 和 552, 其中负边的占比分别为 27.9%、23.6% 和 30.6%, 平均网络连接度分别为 3.2、3.3 和 2.6, 表明多次接种 LH14 使得微生物网络连接度和连接数降低, 网络复杂度降低, 并增加了相互排斥的比例。网络模块化所有处理的网络模块化系数均大于 0.4, 说明网络具有模块化结构, 能被划分为多个独立的集群。多次接种处理的网络模块化系数为 0.86, 大于对照处理的 0.76, 接种 LH14 后网络模块化程度增强表明微生物菌群响应于接种带来的扰动, 从而改变网络结构和功能。

为探究 *Bacillus* 属细菌与其他物种的相互关系, 构建了以 *Bacillus* 为中心的网络 (图 6b), 结果表明对照、单次和多次接种处理的总边数分别为 59、21 和 16, 所有网络正边数占比为 76.2%~83.9%。在



注：不同小写字母表示不同处理组差异显著 ($P < 0.05$)。Note: The different lowercase letter means significant differences with different treatments ($P < 0.05$).

图5 有无接种 LH14 影响下第 8 天和第 26 天水稻根际土壤 16S rRNA 基因拷贝数 (a)、*arsM* 基因拷贝数 (b)，和第 26 天目水平微生物群落组成 (c) 和科水平细菌组成聚类图 (d)

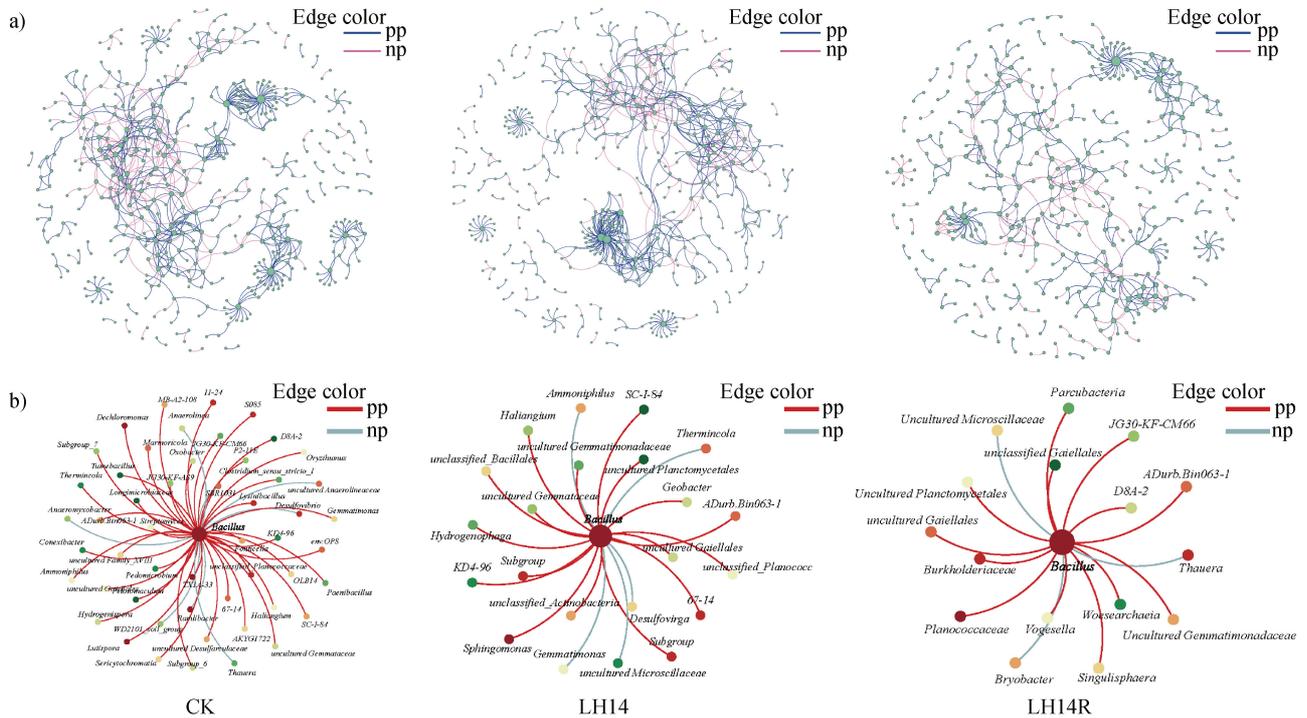
Fig. 5 16S rRNA gene copies number (a) and *arsM* gene copies number (b) in rice rhizosphere soil on days 8 and 26, composition of bacterial communities at the order level (c), and heat map of the top 20 abundant genera at the family level (d) on the day 26 in soil treated with or without the strain LH14

多次接种后与 *Bacillus* 存在正相关关系的物种包括 *Burkholderiaceae*、*Uncultured Gemmatimonadaceae* 和 *Planococcaceae*，而与 *Thauera*、*Bryobacter* 和 *Uncultured Microscillaceae* 为负相关关系。

3 讨论

水稻根际是营养元素吸收转运和重金属砷形态转化的活跃区域，根际分泌的有机物和氧气为好氧砷甲基化微生物提供了生存环境^[8]。淹水条件下土壤中还原释放的 As (III) 在根际除了被微生物或化学氧化外，还可以进行微生物甲基化^[22]。已有研究

表明好氧砷甲基化菌具有较高的砷甲基化效率^[23]，从稻田土壤中分离的 *Cytophagaceae*. SM-1 和 *Streptomyces* sp. strain GSRB54 培养最后的甲基化效率均超过总砷的 50%^[7-8]。本研究中分离自水稻根际土壤的 *Bacillus* sp. LH14 在 34 h 内将 54.9% 的 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 转化为溶解态和气态甲基砷，验证了水稻根际存在砷甲基化能力较强的微生物。*Bacillus* 属中存在多个携带 *arsM* 基因的物种(图 2)，其中 *Bacillus* sp. CX-1 被验证能在 24 h 后将 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 全部转化为 DMAs^[10]。菌株 CX-1 的 *arsM* 基因为组成型表达，转录不受 *arsR* 基因控制，异源表达该 *arsM* 能赋予细胞砷抗性，表明 *arsM*



注：pp，正相关，np，负相关。Note: pp means positive correlations, np means negative correlations.

图 6 有无接种 LH14 影响下根际土壤细菌 ASV 共现网络图 (a) 和芽孢杆菌属相关物种的共现网络图 (b)
Fig. 6 Co-occurrence networks of bacterial ASVs in rhizosphere soil (a) and co-occurrence networks of taxa related to genus *Bacillus* (b) in soil treated with or without the strain LH14

催化的砷甲基化反应是微生物耐受环境中砷的重要机制。本研究菌株 LH14 的 *ArsM* 蛋白序列与 *Bacillus* sp. CX-1 进化距离较远, 并且 LH14 的 *arsM* 在 *arsR* 阻遏蛋白基因下游, 转录受 *arsR* 控制, 表现出携带 *arsM* 的 *Bacillus* 物种间 *arsM* 转录调节方式可能存在差异。此外, 在水稻根际接种 LH14 后主要产物为 DMAs, 与 LB 培养基中砷甲基化产物主要为 TMAsO 不同, 表明不同的底物和生长条件可能导致砷甲基化效率和主要甲基砷产物形态发生变化。菌株 LH14 的 *ArsM* 蛋白与 *Bacillus cereus* 和 *Bacillus thuringiensis* 的进化距离接近, 与 *Bacillus cereus* ATCC14579 相似度为 99.9% 的 *Bacillus* sp. CZ-2 能将 DMAs (III) 转化为挥发性二甲基砷气体^[24], 表明 *Bacillus* 属物种具有多种代谢含砷化合物的途径, 采取不同策略适应环境中不同形态的含砷化合物。稻田土壤淹水条件下 As (III) 可达 5~40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌株 LH14 能耐受 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) 浓度进行生长, 并在土壤体系中显著增加 *arsM* 功能基因丰度, 促进 As (III) 转化为甲基砷, 体现出

LH14 具有应用于土壤砷污染修复的潜力。

芽孢杆菌属物种具有多种有益于植物生长的特性, 影响环境胁迫下植物的抗逆性^[25]。由于三价无机砷 As (III) 与蛋白质辅酶的巯基结合具有生物毒性, As (III) 对水稻生长产生抑制作用, 主要表现为种子萌发减少和生物量降低^[26]。接种具砷抗性的 LH14 提高了高砷浓度条件下的种子萌发率、根和芽长及鲜重和干重, 显示出 LH14 能够缓解砷对水稻生长的胁迫。已有研究表明砷抗性根际菌促进砷污染条件下水稻生长, 可能是因为菌株能够产生植物促生因子 (包括 IAA 和 ACC 脱氨酶)^[17]。根际促生菌能利用植物根系分泌的色氨酸合成 IAA, 直接促进植物细胞伸长和细胞分裂^[27-28]。*Bacillus* sp. LH14 有助于砷胁迫下水稻生长可能与 LH14 在砷胁迫下产 IAA 的能力有关, 类似于之前研究发现接种产 IAA 的根际菌使得植株能更好的在 As 污染土壤中生长^[15, 29]。

在砷污染土壤-水稻体系中接种 LH14 显著增加了水稻植株株高, 可能与其改变水稻根际微生物菌

群有关^[30]。单次接种 LH14 后, 根际土壤中 *Bacillaceae* 相对丰度与 CK 处理无显著差异, 但 LH14 处理富集了其他细菌物种(例如 *Nitrosomonadaceae*), 并在属水平下芽孢杆菌相关的共现网络图中发现, LH14 处理改变了 *Bacillus* 属相关物种关系, 表明 LH14 单次接种能影响其相关物种间相互作用。LH14 多次接种处理中, *Bacillaceae* 丰度增加的同时, 也富集了 *Burkholderiaceae* 和 *Gemmatimonadaceae*, 并且 *Bacillus* 与 *Burkholderiaceae* 和 *Uncultured Gemmatimonadaceae* 存在正相关关系。*Burkholderiaceae* 的物种能产生多种水解酶和生物活性物质, 有利于植物生长和健康, 其中 *B. phytofirmans* 不仅能帮助植物抵御致病菌, 还能增加植物的抗逆性(包括低温、高盐和干旱)^[31]。归属于 *Gemmatimonadaceae* 的 *Gemmatimonas* 属物种被发现与根际土壤营养变化关系紧密, 能够溶解磷从而为植株提供更多磷源, 并且在健康根际土中比病害土壤根际有更高的丰度, 是植物根际促生菌群的核心物种^[32]。由此可见, 多次接种 LH14 处理对植物有益菌 *Burkholderiaceae* 和 *Gemmatimonadaceae* 有富集作用, 从而对砷污染土壤中水稻生长产生积极影响。类似的, 解淀粉芽孢杆菌 FH-1 被报道接种至水稻大田中能显著增加植物有益物种的丰度, 同时提高水稻的生物量和产量, 表明 FH-1 通过改变根际微生物菌群进而促进水稻生长^[33]。另一方面, 已有研究表明甲基砷(尤其是 DMAs) 相比五价砷 As(V) 的植物毒性较高, 导致拟南芥植株茎和根的生物量降低^[34]。但在本研究中多次接种砷甲基化功能菌 LH14 于砷污染土壤后增加了水稻植株的生物量, 表明 LH14 介导的甲基砷产生不是影响水稻生长的主要因素。

4 结 论

本研究验证了水稻根际芽孢杆菌 *Bacillus* sp. LH14 具有较高的甲基砷和挥发能力, 并能耐受 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(III) 进行生长。多次接种 LH14 至砷污染土壤中水稻根际提高了土壤甲基砷浓度, 表明 LH14 可影响根际土壤环境中的砷转化。LH14 具有在砷胁迫下产 IAA 的能力, 增加了高砷浓度下种子萌发率、根和芽长及生物量。LH14 接种显著增加水稻株高, 并提高了根际植物有益菌的相对丰度, 例如 *Burkholderiaceae* 和 *Gemmatimonadaceae*, 表明 LH14

可通过产生植物激素和富集根际有益菌, 直接和间接地促进砷污染土壤中水稻生长, 缓解水稻砷胁迫。

参考文献 (References)

- [1] Zhu Y G, Yoshinaga M, Zhao F J, et al. Earth abides arsenic biotransformations[J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2014, 42: 443—467.
- [2] Zhao F J, McGrath S P, Meharg A A. Arsenic as a food chain contaminant: Mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 535—559.
- [3] Qiao J T, Li X M, Hu M, et al. Transcriptional activity of arsenic-reducing bacteria and genes regulated by lactate and biochar during arsenic transformation in flooded paddy soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52 (1): 61—70.
- [4] Wang P P, Chen S C, Zhu Y G, et al. Advances in the research of arsenic methylation and volatilization by microorganisms[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37 (7): 1377—1385. [王培培, 陈松灿, 朱永官, 等. 微生物砷甲基化及挥发研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37 (7): 1377—1385.]
- [5] Xue X M, Zhu Y G. Arsenic biotransformation in soils and its relationship with antibiotic resistance[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2019, 56 (4): 763—772. [薛喜枚, 朱永官. 土壤中砷的生物转化及砷与抗生素抗性的关联[J]. *土壤学报*, 2019, 56 (4): 763—772.]
- [6] Qin J, Rosen B P, Zhang Y, et al. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (7): 2075—2080.
- [7] Huang K, Chen C, Zhang J, et al. Efficient arsenic methylation and volatilization mediated by a novel bacterium from an arsenic-contaminated paddy soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50 (12): 6389—6396.
- [8] Kuramata M, Sakakibara F, Kataoka R, et al. Arsenic biotransformation by *Streptomyces* sp. isolated from rice rhizosphere[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17 (6): 1897—1909.
- [9] Zhang J, Cao T T, Tang Z, et al. Arsenic methylation and volatilization by arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase in *Pseudomonas alcaligenes* NBRC14159[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (8): 2852—2860.
- [10] Huang K, Xu Y, Packianathan C, et al. Arsenic methylation by a novel ArsM As (III) S-adenosylmethionine methyltransferase that requires only two conserved cysteine residues[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 107 (2): 265—276.
- [11] Chen J, Sun G X, Wang X X, et al. Volatilization of arsenic from polluted soil by *Pseudomonas putida* engineered for expression of the *arsM* Arsenic (III)

- S-adenosine methyltransferase gene[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48 (17): 10337—10344.
- [12] Liu S, Zhang F, Chen J, et al. Arsenic removal from contaminated soil via biovolatilization by genetically engineered bacteria under laboratory conditions[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23 (9): 1544—1550.
- [13] Zhang J, Xu Y, Cao T T, et al. Arsenic methylation by a genetically engineered *Rhizobium*-legume symbiont[J]. Plant and Soil, 2017, 416 (1): 259—269.
- [14] Kumar S, Choudhary A K, Suyal D C, et al. Leveraging arsenic resistant plant growth-promoting rhizobacteria for arsenic abatement in crops[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 425: 127965.
- [15] Ghosh P K, Maiti T K, Pramanik K, et al. The role of arsenic resistant *Bacillus aryabhatai* MCC3374 in promotion of rice seedlings growth and alleviation of arsenic phytotoxicity[J]. Chemosphere, 2018, 211: 407—419.
- [16] Pandey S, Ghosh P K, Ghosh S, et al. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities[J]. Journal of Microbiology, 2013, 51 (1): 11—17.
- [17] Das S, Jean J S, Chou M L, et al. Arsenite-oxidizing bacteria exhibiting plant growth promoting traits isolated from the rhizosphere of *Oryza sativa* L.: Implications for mitigation of arsenic contamination in paddies[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 302: 10—18.
- [18] Bist V, Anand V, Srivastava S, et al. Alleviative mechanisms of silicon solubilizing *Bacillus amyloliquefaciens* mediated diminution of arsenic toxicity in rice[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 428: 128170.
- [19] Nautiyal C S, Srivastava S, Chauhan P S, et al. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 66: 1—9.
- [20] Cheng T, Yao X Z, Wu C Y, et al. Endophytic *Bacillus megaterium* triggers salicylic acid-dependent resistance and improves the rhizosphere bacterial community to mitigate rice spikelet rot disease[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 156: 103710.
- [21] Anand V, Kaur J, Srivastava S, et al. Potential of methyltransferase containing *Pseudomonas oleovorans* for abatement of arsenic toxicity in rice[J]. Science of the Total Environment, 2023, 856: 158944.
- [22] Zhong S X, He H F, Chen Z L, et al. Advancement in study on biochemical behavior of arsenic in flooded paddy soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2018, 55 (1): 1—17. [钟松雄, 何宏飞, 陈志良, 等. 水淹条件下水稻土中砷的生物化学行为研究进展[J]. 土壤学报, 2018, 55 (1): 1—17.]
- [23] Viacava K, Meibom K L, Ortega D, et al. Variability in arsenic methylation efficiency across aerobic and anaerobic microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54 (22): 14343—14351.
- [24] Chen C, Huang K, Xie W Y, et al. Microbial processes mediating the evolution of methylarsine gases from dimethylarsenate in paddy soils[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51 (22): 13190—13198.
- [25] Saxena A K, Kumar M, Chakdar H, et al. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128 (6): 1583—1594.
- [26] Abedin M J, Meharg A A. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant and Soil, 2002, 243 (1): 57—66.
- [27] Ma Y, Prasad M N V, Rajkumar M, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29 (2): 248—258.
- [28] Glick B R, Penrose D M, Li J P. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria[J]. Journal of Theoretical Biology, 1998, 190 (1): 63—68.
- [29] Srivastava S, Verma P C, Chaudhry V, et al. Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 262: 1039—1047.
- [30] Wang S Q, Wei S J, Yang T T, et al. Effect of streptomyces JD211 promoting growth of rice seedlings and diversity of soil bacteria[J]. Acta Pedologica Sinica, 2015, 52 (3): 673—681. [王世强, 魏赛金, 杨陶陶, 等. 链霉菌 JD211 对水稻幼苗促生作用及土壤细菌多样性的影响[J]. 土壤学报, 2015, 52 (3): 673—681.]
- [31] Eberl L, Vandamme P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys[J]. F1000Research, 2016, 5: F1000FacultyRev-1007.
- [32] Liu C, Zhuang J Y, Wang J, et al. Soil bacterial communities of three types of plants from ecological restoration areas and plant-growth promotional benefits of *Microbacterium invictum*(strain X-18) [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 926037.
- [33] Li Q Q, Xu S, Zhao W, et al. Rhizosphere microbiome mediated growth-promoting mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* FH-1 on rice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59 (12): 2410—2426. [李晴晴, 徐松, 赵维, 等. 根际微生物组介导的解淀粉芽孢杆菌 FH-1 对水稻的促生机制[J]. 微生物学报, 2019, 59 (12): 2410—2426.]
- [34] Tang Z, Kang Y Y, Wang P T, et al. Phytotoxicity and detoxification mechanism differ among inorganic and methylated arsenic species in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Soil, 2016, 401 (1): 243—257.

(责任编辑: 卢 萍)