

会泽铅锌尾矿区豆科植物根瘤菌耐铅锌性及其生理生化特征研究

缪福俊, 熊 智, 李素婷, 孙 浩, 李 彪

(西南林业大学, 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 昆明 650224)

摘 要:研究铅锌尾矿区豆科植物根瘤菌对铅锌的响应,可为利用豆科植物改良尾矿区土壤及植被恢复提供理论依据。会泽铅锌尾矿土壤被铅锌严重污染,铅锌含量分别是全国土壤(A层)的110倍和54倍。通过现场采样、室内分离和耐性培养,对10株分离自会泽铅锌尾矿区豆科植物的根瘤菌的铅、锌单盐与铅锌双盐逆境进行了耐性研究。结果表明,该区域的豆科植物根瘤菌对铅、锌单盐逆境具有良好的耐性,但是对铅锌双盐的耐受明显减弱。对这10株根瘤菌的生理生化特征研究结果表明,会泽尾矿区根瘤菌的生理生化特性存在广泛差异,根瘤菌铅锌耐性越强,其阳性生理生化特征越多。一株与三叶草共生接瘤的HS3,一株与香豌豆共生接瘤的HX6和一株与猪屎豆共生接瘤的HZ8,它们不但表现出耐铅锌,而且生理代谢广泛,显示这3株根瘤菌在铅锌尾矿区的利用具有较好的潜能。

关键词:会泽铅锌尾矿;根瘤菌;耐性;生理生化特征

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672–2043(2010)10–1943–05

Tolerance and Physiological Response to Lead–zinc Stress of Rhizobia Isolated from Nodules of Leguminous Plants in Lead–zinc Mining Tailing of Huize, China

MIAO Fu–jun, XIONG Zhi, LI Su–ting, SUN Hao, LI Biao

(Southwest Forestry University, Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Kunming 650224, China)

Abstract: It is important and useful for soil remediation and revegetation in lead–zinc mining tailings to study lead–zinc tolerance of rhizobia. The soil of Huize lead–zinc mining tailings was seriously contaminated by Pb, Zn. The contents of Pb and Zn were about 110 and 54 times of the average content of heavy metals of soil layer A in China respectively. In this paper, ten rhizobia strains were isolated from nodules of leguminous plants occurring naturally in Huize lead–zinc mining tailings, and their tolerance to single lead salt, single zinc salt and lead–zinc salt were studied. The results showed that most of strains exhibited significantly strong capability to tolerate single lead and single zinc salt, but the tolerance capability to lead and zinc salt was very weak. The results of study on physiological and biochemical characteristics of these strains showed that there existed metabolic differences among them, and the stronger rhizobia possesses lead–zinc tolerance, the more positive physiological and biochemical characteristics there appeared to be. This phenomenon suggested seemingly that the rhizobia adjusted their metabolic pathway to contaminated environment by lead–zinc. Among them, strain HS3, HX6 and HZ8 not only manifested strong lead–zinc tolerance, but also showed diversified metabolic pathways. Strain HS3 was isolated from nodules of *Trifolium repens*, strain HX6 from *Lathyrus odoratus* and strain HZ8 from *Crotalaria mucronata* respectively, Which could be applied for soil remediation and revegetation in lead–zinc mining tailings.

Keywords: Huize lead–zinc mining tailings; rhizobia; stress tolerance; physiological and biochemical characteristics

收稿日期:2010–04–26

基金项目:国家自然科学基金项目(30860067);国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室基金项目(2006kj)

作者简介:缪福俊(1986—),男,甘肃兰州人,硕士研究生,研究方向为植物学。E-mail:mfjq520@163.com

通讯作者:熊 智 E-mail:zhix65.swfc@gmail.com

云南省会泽铅锌尾矿区规模大^[1],土壤重金属污染严重,植被退化,亟待生态恢复^[2-3]。该尾矿区植被恢复的最重要限制因子是重金属胁迫和养分短缺,其中氮素极端缺乏更为关键^[4-6]。具有共生固氮能力的豆科植物是实现这类重金属污染土壤生态恢复的潜在候选物种,具有促进土壤营养元素(特别是 N 元素)循环和积累,且可能吸附重金属或转化其形态,降低毒性,实现植物-微生物高效复合修复效果^[7-9]。矿区废弃地豆科植物修复成功与否决定于豆科植物及其共生根瘤菌对重金属的耐受能力,因此筛选具有优良抗(耐)性的根瘤菌至为关键^[10-11]。会泽铅锌尾矿区现存植被的植物种类大部分是耐重金属、耐贫瘠的豆科植物和草本植物。三叶草(*Trifolium repens* L.)、香豌豆(*Lathyrus odoratus* L.)、猪屎豆(*Crotalaria mucronats* Desv.)等在尾矿区比较常见,具有耐贫瘠、耐重金属的特点,是改良此类土壤的优良潜在植物^[12]。

本研究拟对自该尾矿区自然生长豆科植物根部分离得到的根瘤菌进行耐重金属及生理生化比较研究,以期筛得耐性强的优良根瘤菌菌株,并应用于尾矿区植被恢复初期的拌种,实现改良土壤、修复土壤的目的,为后期其他植物的定植、引入创造条件。

1 材料与方法

1.1 植物采样与根瘤菌菌株分离

2009 年 9 月份在会泽铅锌尾矿区内共设立 200 个网格,对尾矿区豆科植物类群进行全面调查,调查相对密度(样地内某一种植物的个体数占全部植物种个体数的百分比)和相对频度(某种植物出现的样方数占整个样方数的百分比),最后两者之和的大小确定要采集的优势豆科植物类群。样地上类群有豆科植物 8 个种。三叶草、香豌豆和猪屎豆的相对密度和相对频度较高,在尾矿区上普遍发生,确定为豆科植物的优势类群,见表 1。其余植物种类的相对密度和相对频度低,而且基本分布在尾矿区边缘零星发生,不作为本次研究的样品。

通过采用交叉间隔布点法在选好的样区内进行多株采样,采集有代表性、生长旺盛、数量较多的这 3 种自然生长的豆科植物。选取饱满健壮的根瘤存入装有变色硅胶的 5 mL 冻存小管干燥并编号、记录以短期保存根瘤,同时采集根瘤际土壤于密封袋,带回实验室备用。干燥的根瘤在分离之前,于蒸馏水中浸泡复苏过夜表面消毒后采用 YMA 培养基平板法分离纯化根瘤,用镜检、染色和回接结瘤检验菌株的纯度,

表 1 会泽铅锌尾矿区豆科植物的相对密度和频度

Table 1 The relative density and frequency of leguminous plants occurring in Huize lead-zinc mining tailings

豆科植物种类 Type of leguminous plant	相对密度/% relative density	相对频度/% relative frequency	合计 total
三叶草 <i>Trifolium repens</i> L.	33	27	60
香豌豆 <i>Lathyrus odoratus</i> L.	28	24	52
猪屎豆 <i>Crotalaria mucronats</i> Desv.	24	31	55
野豇豆 <i>Vigna vexillata</i> (Linn.)Rich.	5	8	13
美丽胡枝子 <i>Lespedeza formosa</i> (Vog.)Koehne	6	3	9
其他 3 种植物 (the other plants)	4	7	11

得到 10 株根瘤菌(表 2)。ARDRA 分析结果表明,这 10 株菌株存在较大的差异,经活化后待用。

表 2 会泽铅锌尾矿区自然生长的豆科植物根瘤菌

Table 2 The rhizobia strains isolated from the leguminous plants naturally grown in Huize lead-zinc mining tailings

菌株(Strains)	宿主植物(Host plants)
HS1、HS2、HS3	三叶草 <i>Trifolium repens</i> L.
HX4、HX5、HX6、HX7	香豌豆 <i>Lathyrus odoratus</i> L.
HZ8、HZ9、HZ10	猪屎豆 <i>Crotalaria mucronats</i> Desv.

1.2 土壤铅、锌含量测定

土壤样品经室温风干后,测试分析在云南省农科院植保土肥所测试分析中心进行。用原子吸收分光光度计(WFX-110)测定 2 种重金属元素(Pb、Zn)含量。土壤锌的测定按 GB/T17138—1997、土壤铅的测定按 GB/T17141—1997 方法进行。取不同采集点的平均值代表该区域的铅锌污染状况。

1.3 不同菌株耐重金属性测定

以上述土壤重金属含量测定结果为依据,按剂量添加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 母液于经过灭菌的 YMA 培养基,制成含不同浓度的单盐与双盐重金属选择性培养基平板。

单盐试验:将供试菌株接种在含有不同单盐浓度的重金属选择性平板上,铅盐浓度依次是 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 锌盐浓度依次是 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,以无重金属的 YMA 平板作为阳性对照,采用多点接种方法,每个处理设 3 个重复,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养观察 2~10 d,生长记为“+”,不生长记为“-”。

双盐试验:将供试菌株接种在含有铅、锌双盐重

金属选择性平板上,其双盐浓度如表 3,以无重金属的 YMA 平板作为阳性对照,接种、培养、观察记录同上。

表 3 测试双盐耐性的铅、锌双盐浓度梯度($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

重金属类型 heavy meltals	Pb,Zn 浓度梯度 concentrations of double lead and zinc salt				
	C1	C2	C3	C4	C5
Pb ²⁺	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Zn ²⁺	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0

1.4 生理生化实验

按照微生物生理生化实验方法进行^[13],对供试菌株进行油脂水解、淀粉水解、明胶液化、吡啶实验、甲基红(M.R.)实验、乙酰甲基甲醇(V.P.)实验共 6 项生理生化指标进行测定,观察记录同上。

2 结果与分析

2.1 尾矿区土壤重金属含量特点

会泽铅锌尾矿区土壤铅锌含量测定结果表明(表 4),会泽铅锌尾矿区土壤中重金属的含量 $\text{Zn}>\text{Pb}$,分别是全国土壤(A 层)背景值的 54 倍和 110 倍^[14]。说明尾矿区含较高铅、锌元素,污染严重,其中铅污染最

严重,亟待改良。

2.2 不同菌株耐重金属能力培养试验比较

2.2.1 不同菌株单盐胁迫耐性比较

从表 5 可以看出,80%的菌株能在浓度 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铅盐胁迫下生长,90%的菌株能在浓度 $3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的锌盐胁迫下生长,说明这些来自尾矿区自然生长的豆科植物根瘤中的大多数菌株对铅、锌重金属具有良好的耐性。其中菌株 HS3、HX6、HZ8 能在 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铅盐胁迫下生长,菌株 HS3、HZ8 在 $6.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的锌盐胁迫下生长,菌株 HX6 在 $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的锌盐胁迫下生长,表现出较强的耐铅、锌能力。总体上看,随着铅锌浓度的增大,菌株的耐性下降。各菌株耐锌能力高于耐铅能力。

2.2.2 不同根瘤菌菌株对双盐胁迫的响应

表 6 表明,90%的菌株能够在 $[1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 铅}+2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 锌}]$ 的双盐胁迫下生长,30%的菌株能在 $[3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 铅}+4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 锌}]$ 的双盐胁迫下生长,表明来自尾矿区豆科植物的根瘤菌株对铅、锌双盐胁迫具有一定的耐性。其中菌株 HS3 与 HZ8 为铅锌高耐性菌株,可以耐受 $[4.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 铅}+5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 锌}]$ 双盐胁迫,其次是 HX6。但在铅、锌双重胁迫下,菌株的生长弱于铅、锌单独胁迫下的生长状况,说明铅锌

表 4 会泽铅锌尾矿区土壤的铅、锌含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 4 The lead and zinc contents in Huize lead-zinc mining tailings($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

重金属类型(heavy meltals)	Pb	Zn
尾矿区土壤重金属平均含量 Average content of heavy meltals in Huize lead-zinc mining tailings	2 861.45±438.52	4 027.26±859.24
全国土壤(A 层)背景平均值 Average content of heavy meltals of soil layer A in China	26.00	74.20
尾矿区与全国土壤(A 层)背景平均值的倍数 Multiples comparing the content of heavy meltals in mining tailings with soil layer A in China	110.06	54.28

表 5 不同 Pb、Zn 单盐浓度下 10 株根瘤菌生长

Table 5 Growth of 10 rhizobia strains under various single Pb and Zn salt concentrations

菌株 Strain	对照 CK	单铅浓度梯度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Growth of 10 rhizobia strains under single Pb concentrations						单锌浓度梯度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Growth of 10 rhizobia strains under Single Zn concentrations					
		2	3	4	5	6	7	2	3	4	5	6	7
HS1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
HS2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
HS3	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
HX4	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
HX5	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
HX6	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
HX7	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
HZ8	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
HZ9	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
HZ10	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

表 6 不同铅锌双盐浓度下 10 株根瘤菌生长
Table 6 Growth of 10 rhizobia strains under various
Pb-Zn salt concentrations

菌株 strain	对照 CK	铅-锌双盐浓度下根瘤菌生长 Growth of 10 rhizobia strains under Pb-Zn salt concentrations				
		C1	C2	C3	C4	C5
HS1	+	+	+	-	-	-
HS2	+	+	-	-	-	-
HS3	+	+	+	+	+	-
HX4	+	+	+	-	-	-
HX5	+	+	+	-	-	-
HX6	+	+	+	+	-	-
HX7	+	+	+	-	-	-
HZ8	+	+	+	+	+	-
HZ9	+	-	-	-	-	-
HZ10	+	+	-	-	-	-

胁迫对根瘤菌生长的抑制作用有累加效应。

Carrasco 等^[15]在黄铁矿溢出污染区,分离得到41株耐 2.4 mmol·L⁻¹ Pb²⁺的菌株。聂湘平等^[16]发现大叶相思的根瘤菌可以耐受小于 10.0 mmol·L⁻¹ Zn²⁺胁迫。比照前人研究结果,可以基本确认该菌株对 Zn²⁺、Pb²⁺的抗性比较显著,有潜在价值。

2.3 生理生化指标及与耐性关系分析

供试菌株生理生化指标结果如表 7, 可以看出会泽铅锌尾矿区的豆科植物不同根瘤菌菌株生理生化方面表现丰富的多样性。在这 6 项生理生化特性中, HS3、HX6、HZ8 根瘤菌株表现出了阳性结果多于阴性结果,而这 3 株刚好是耐铅锌能力强的菌株,说明根瘤菌耐铅锌能力可能与生理代谢广泛性有关。其余 7 株在生理生化方面,阴性结果较多,分解油脂、淀粉、

明胶等的能力较弱,其耐铅锌能力也较弱,表明菌株耐铅锌能力与所测生理指标有密切相关性,暗示着根瘤菌的耐性与代谢途径改变与适应有关。可见,本文所测的几个生理生化指标,可以作为根瘤菌抗铅锌菌株初步筛选的一个参考指标。有研究表明,细胞通过代谢途径发生变化来增加抗性,适应环境^[17]。

3 讨论

会泽铅锌尾矿区含较高铅、锌元素,污染严重,其中铅污染最严重,对尾矿区的植物调查表明,这 3 种豆科植物在重金属含量极高的尾矿区生长且数量较多,并没发生较为严重的重金属毒害现象,可能与豆科植物根部存在有根瘤菌有关。对其共生的根瘤菌进行耐铅锌胁迫和生理生化特性研究,发现这些来自尾矿区自然生长的豆科植物根瘤菌中的大多数菌株对铅、锌重金属具有良好的耐性,但在铅、锌双重胁迫下,菌株的生长弱于铅、锌单独胁迫下的生长状况,说明铅锌胁迫对根瘤菌生长的抑制作用有累加效应。供试菌株生理生化指标结果说明根瘤菌耐铅锌能力可能与生理代谢广泛性有关,可以作为根瘤菌抗铅锌菌株初步筛选的一个参考指标。

若能将抗重金属能力较强的根瘤菌,在尾矿区植被恢复初期时使用,接种到豆科植物使之形成共生固氮体系,可增强豆科植物的抗逆性,而且这种体系能长期固定空气中的氮,增加尾矿区土壤中的氮肥,使土壤肥沃,为后期其他植物的定植、引入创造条件,从而逐渐恢复尾矿区生态。利用豆科植物-根瘤菌共生体系来修复矿区尾矿废弃地,具有广阔的应用前景,值得进一步研究。

表 7 根瘤菌的生理生化指标测定结果
Table 7 The physiological and biochemical indexes of ten rhizobia strains

菌株 strain	油脂水解 fat hydrolysis	淀粉水解 starch hydrolysis	V.P.实验 V.P experiment	M.R.实验 M.R. experiment	明胶液化 gelatin liquefaction	吡啶实验 indole test
HS1	-	-	-	-	-	+
HS2	-	+	-	-	-	-
HS3	-	+	+	+	-	+
HX4	-	+	-	-	-	-
HX5	-	+	+	-	-	-
HX6	+	+	-	-	+	+
HX7	+	-	-	-	-	-
HZ8	+	+	+	-	+	+
HZ9	-	-	+	-	-	-
HZ10	-	+	-	-	+	-

4 结论

分离自会泽铅锌尾矿区既存植物根瘤的10株根瘤菌对铅、锌重金属具有良好的耐性能力。铅锌双盐胁迫对根瘤菌的毒害作用大于其单盐效应。耐性菌株分解利用油脂、淀粉、蛋白胨等物质的能力较强,根瘤菌耐性很可能是与这些分解利用过程能力有关。通过单盐胁迫和双盐胁迫模拟筛选,从分离菌株中得到3株高耐性根瘤菌HS3、HX6、HZ8,它们分别与豆科植物三叶草、香豌豆和猪屎豆共生。不同豆科植物上都有耐性较强的根瘤菌与之共生,但根瘤菌种类并不相同。

参考文献:

- [1] 梁昌聪,肖艳萍,赵之伟. 云南会泽废弃铅锌矿区植物丛枝菌根和深色有隔内生真菌研究[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(6): 811-817.
- LIANG Chang-cong, XIAO Yan-ping, ZHAO Zhi-wei. Arbuscular mycorrhiza and dark septate endophytes in an abandoned lead-zinc mine in Huize, Yunnan, China[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007, 13(6): 811-817.
- [2] 卓莉,沈王庆. 铅锌尾矿对环境污染的初步研究[J]. 中国科技信息, 2007(12): 16-18.
- ZHUO Li, SHEN Wang-qing. Preliminary study on the pollution of lead and zinc mine tailing [J]. *China Science and Technology Information*, 2007(12): 16-18
- [3] 蔡嗣经,杨鹏. 金属矿山尾矿问题及其综合利用与治理[J]. 中国工程科学, 2000, 2(4): 89-92.
- CAI Si-jing, YANG Peng. Tailings problems and tailings utilization and treatments in the metal mines[J]. *Engineering Science*, 2000, 2(4): 89-92.
- [4] 王海鸥,徐海洋,钟广蓉,等. 根际微生物对植物修复重金属污染土壤作用的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(30): 14832-14834.
- WANG Hai-ou, XU Hai-yang, ZHONG Guang-rong, et al. Progress in effect of rhizosphere microbes on phytoremediation of soil polluted by heavy metal[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2009, 37(30): 14832-14834.
- [5] Williamson N A, Johnson M S, Bradshaw A D. Mine wastes reclamation: The establishment of vegetation on metal mine wastes[M]. London: Mining Journal Books, 1982.
- [6] Sofia I A P, Ana I G L, Etelvina A P F. Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae isolated from contaminated portuguese soils[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 56: 176-186.
- [7] Poonam C, Dudeja S S, Kkapoor K K. Effectivity of host-rhizobium leguminosarum symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals[J]. *Microbiological Research*, 2004, 159(2): 121-127.
- [8] Izquierdo I, Caravaca F, Alguacil M M, et al. Use of Microbiological indicators for evaluating success in soil resttation after revegetation of a mining area under subtropical cotions[J]. *Applied Soil Ecology*, 2005, 30: 3-10.
- [9] Zhang C B, Huang L N, Wong M HONGM H, et al. Characteriza of soil physico-chemical and microbial parameters after revegetation near shao-guan Pb/Zn smelter, Guangdong, P. R. China [J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2006, 177: 81-101.
- [10] 梁建强,段晓丹,崔广玲,等. 西北地区金属尾矿地根瘤菌的重金属抗性及其系统发育研究 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6): 1120-1126.
- LIANG Jian-qiang, DUAN Xiao-dan, CUI Guang-ling, et al. Heavy metal tolerance and phylogenetic analysis of rhizobia isolated from metal tailings in Northwestern China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(6): 1120-1126.
- [11] 王亚雄,郭瑾珑,刘瑞霞. 微生物吸附剂对重金属的吸附特性[J]. 环境科学, 2001, 22(6): 72-75.
- WANG Ya-xiong, GUO Jin-long, LIU Rui-xia. Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge[J]. *Environmental Science*, 2001, 22(6): 72-75
- [12] 徐开未,张小平,陈远学,等. 金沙江干热河谷区山蚂蝗属根瘤菌抗逆性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 501-503.
- XU Kai-wei, ZHANG Xiao-ping, CHEN Yuan-xue, et al. Study on the stress resistance of *Rhizobia* isolated from desmodium in arid hot valley of Jinsha River[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2009, 37(2): 501-503.
- [13] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 216-218.
- SHEN Ping, FAN Xiu-rong, LI Guang-wu. Microbiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 216-218.
- [14] 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 87-378.
- Environmental Monitoring in China. Soil environmental background concentrations in China[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990: 87-378.
- [15] Carrasco J A, Armario P, Pajuelo E, et al. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Anal collar pyrite mine[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 1131-1140.
- [16] 聂湘平,蓝崇钰,张志权,等. 锌对大叶相思-根瘤菌共生固氮体系影响研究[J]. 植物生态学报, 2002, 26(3): 264-268.
- NIE Xiang-ping, LAN Chong-yu, ZHANG Zhi-quan, et al. Effect of zinc on rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculiformis*) symbiotic association[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2002, 26(3): 264-268.
- [17] 王嘉,王仁卿,郭卫华. 重金属对土壤微生物影响的研究进展[J]. 山东农业科学, 2003, 22(4): 408-411.
- WANG Jia, WANG Ren-qing, GUO Wei-hua. Effect of heavy metal on soil microorganism[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2003, 22(4): 408-411.