

陕西商州铅锌尾矿区豆科植物根瘤菌耐铅锌胁迫能力及其生理生化特征

冀玉良¹, 韦革宏²

(1. 商洛学院生物医药与食品工程学院, 陕西 商洛 726000;
2. 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以从陕西商州铅锌尾矿区豆科植物中分离纯化的 12 株根瘤菌为对象, 采用固体平板接种培养法研究了菌株耐铅、锌单盐与铅锌双盐胁迫的能力, 同时用液体试管振荡培养法测定了菌株的生理生化特征。结果表明, 该区域的豆科植物根瘤菌对铅、锌单盐胁迫具有良好的耐性, 但对铅锌双盐胁迫的耐性明显低于单盐。耐性菌株在生理生化特性上存在广泛差异, 对铅锌耐性越强的根瘤菌, 其阳性生理生化特征也越多。实验初步筛选到了 3 株耐铅锌胁迫能力强的根瘤菌菌株 CH3、MX7 和 HZ10, 它们分别与豆科植物刺槐 (*Robinia pseudoacacia*)、天蓝苜蓿 (*Medicago lupulina*) 和多花胡枝子 (*Lespedeza floribunda* Bunge) 共生。研究可以得出耐性根瘤菌对铅锌胁迫的抵抗能力可能是建立在其具有多种生理代谢反应基础上的, 即它们通过改变代谢途径以适应重金属的污染环境, 对铅锌胁迫耐性强的根瘤菌菌株在重金属尾矿区的土壤和植被恢复中有潜在的开发应用价值。

关键词: 铅锌尾矿; 根瘤菌; 耐铅锌胁迫; 生理生化特征
中图分类号: Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7601(2014)04-0009-05

Tolerance and physiological response of rhizobia isolated from leguminous plants to lead-zinc stress in tailing area of Shangzhou District

Ji Yu-liang¹, WEI Ge-hong²

(1. College of Life Science, Medical Engineering and Food Science, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000, China;
2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: With twelve rhizobium strains that were isolated from nodules of leguminous plants growing naturally in the tailing area of lead-zinc mine in Shangzhou District, Shangluo City, Shaanxi Province as study object, their tolerance to lead salt stress, zinc salt stress and lead-zinc double salt stress was investigated by using solid tablet inoculation culture method, and their physiological and biochemical characteristics were determined by using liquid tube oscillation culture method. The results showed that the rhizobium strains exhibited strong capability to tolerate single lead or zinc salt, but their tolerance capability to lead-zinc double salt was significantly lower than that to single salt. There were considerable differences of physiological and biochemical characteristics among the strains. The stronger the tolerance to lead-zinc stress a rhizobium strain possessed, the more positive physiological and biochemical characteristics it showed. Three rhizobium strains with high tolerance to lead and zinc stress were preliminarily screened out, i. e., CH3 isolated from nodules of *Robinia pseudoacacia*, MX7 isolated from *Medicago lupulina* and HZ10 isolated from *Lespedeza floribunda* Bunge. It can be concluded that the tolerance of rhizobia to lead-zinc stress is seemingly built on the basis of their various physiological metabolism reactions, that is to say, the rhizobia are likely to adjust their metabolic pathway to be adaptable to the environment contaminated by lead and zinc. The rhizobium strains with strong tolerance to lead-zinc stress exhibit a potential application value in soil remediation and revegetation in tailing area of lead-zinc mine.

Keywords: tailing area of lead-zinc mine; rhizobium; tolerance to lead-zinc stress; physiological and biochemical characteristic

收稿日期: 2013-10-05
基金项目: 陕西省科技厅科学技术研究项目(2011JM3012); 陕西省商洛市科技局研究计划项目(SK12010-09); 商洛学院服务地方专项科研基金项目(13SKY-FWDF004)
作者简介: 冀玉良(1965—), 男, 陕西洛南人, 副教授, 硕士, 研究方向为微生物生理生化和微生物与植物的互动。E-mail: jyl65@126.com。

陕西商洛地区在地质演变中形成了丰富的矿产资源,近几年随着经济的快速发展,境内各县区矿产资源特别是铅锌矿大量开采,尾矿区土壤重金属污染日益严重,植被开始发生退化,区域生态环境质量有所下降,所以治理尾矿污染已成为区域保持可持续发展的迫切任务。同时由于商洛是地处秦岭南麓的多山地区,境内土地十分贫瘠,养分缺乏,尤其是氮素不足,这就使消除重金属污染,恢复尾矿区植被面临更多限制性因子^[1-3]。根据现有的研究,根瘤菌与豆科植物共生体系在修复重金属污染土壤中有很大的开发潜力,它不仅能够促进土壤营养元素特别是 N 元素的循环和积累,而且能够通过对重金属的吸附、转化其形态而降低其毒性,以达到植物-微生物高效复合修复的效果^[4-6]。据调查,生长于商州铅锌尾矿区的豆科植物主要是刺槐(*Robinia pseudoacacia*)、天蓝苜蓿(*Medicago lupulina*)、多花胡枝子(*Lespedeza floribunda* Bunge)、草木樨(*Melibotus albus* L.)、木蓝(*Indigofera tinctoria* L.)、三叶草(*Trifolium repens* L.)、野豌豆(*Vicia sativa* L.)、合欢(*Albizia julibrissin*)和锦鸡儿(*Caragana sinica*)等,这些都是耐贫瘠、耐干旱的木本或草本植物,是改良土壤涵养水分的优良物种^[7],在区域生态环境的维持中发挥着重要的作用,然而关于这些植物与根瘤菌共生系统在消除本区域重金属尾矿污染中的作用目前尚缺乏系统的研究和认识。

本研究拟从自然生长于商州尾矿区的豆科植物分离得到根瘤菌,并对根瘤菌进行抗铅锌胁迫能力和生化特征的比较研究,以期筛选到对铅锌耐性强的优良根瘤菌菌株应用于尾矿区植被恢复初期植树造林和作物种植的拌种促生,实现改良土壤、修复生态的目的,并为后期其他植物的引入和定植创造条件^[8-11]。

1 材料与方法

1.1 植物采样和根瘤菌菌株分离

商洛市位于陕西省东南部,辖商州区和镇安、丹凤、商南、洛南、山阳、柞水 6 个县。商州铅锌矿区位于商州区内,地处秦岭山脚,丹江源头,商州西北边陲,距州城 27 km 的黑龙口镇。采样中根据尾矿区范围将其划分成 90 个网格,调查尾矿区豆科植物类群,确定相对密度(采样区某一种植物个体数占全部植物个体数的百分比)和相对频度(某种植物分布的样方数占整个样方数的百分比),按照两者之和大小确定要采集豆科植物的优势类群。调查发现采样区

内分布的豆科植物类群有 9 个种。分别是刺槐、天蓝苜蓿、多花胡枝子、草木樨、木蓝、三叶草、野豌豆、合欢和锦鸡儿,其中刺槐、天蓝苜蓿、多花胡枝子和草木樨相对密度和相对频度较高,在尾矿区普遍存在,确定为优势类群(表 1)。其余种类相对密度和相对频度较低,且零星分布于尾矿区边缘,不选为本次研究的样品。

表 1 商州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 growing in the tailing area of lead-zinc mine in Shangzhou

豆科植物种类 Type of leguminous plant	相对密度/% Relative density	相对频度/% Relative frequency
刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>	29	28
天蓝苜蓿 <i>Medicago lupulina</i>	24	25
多花胡枝子 <i>Lespedeza floribunda</i> Bunge	18	20
草木樨 <i>Melibotus albus</i> L.	17	17
木蓝 <i>Indigofera tinctoria</i> L.	3	4
三叶草 <i>Trifolium repens</i> L.	3	1
野豌豆 <i>Vicia sativa</i> L.	2	2
合欢 <i>Albizia julibrissin</i>	3	1
锦鸡儿 <i>Caragana sinica</i>	1	2

采用交叉间隔布点法在样区内进行多株采样,采集有代表性、生长旺盛、数量较多的 4 种豆科植物(刺槐、天蓝苜蓿、多花胡枝子和草木樨)的根瘤,从中选取健壮饱满的根瘤存入装有变色硅胶的 5 mL 冻存干燥管,并记录、编号。在采集根瘤的同时采集根瘤周围土壤 1 kg 装入密封袋带回,用于采样点土壤铅锌含量的测定。根瘤菌的分离在根瘤带回实验室后短期内进行,干燥的根瘤在分离前先在蒸馏水中浸泡过夜复苏,经表面消毒,采用 YMA 培养基平板划线分离纯化,并用染色、镜检和回接进行结瘤检验^[7],最后得到 12 株根瘤菌(表 2)。

表 2 商州铅锌尾矿区自然生长的豆科植物根瘤菌
Table 2 The rhizobium strains isolated from leguminous plants naturally growing in the tailing area of lead-zinc mine in Shangzhou

菌株 Strain	宿主植物 Host plant
CH1, CH2, CH3	刺槐 <i>Robinia pseudoacacia</i>
MX4, MX5, MX6, MX7	天蓝苜蓿 <i>Medicago lupulina</i>
HZ8, HZ9, HZ10	多花胡枝子 <i>Lespedeza floribunda</i> Bunge
CM11, CM12	草木樨 <i>Melibotus albus</i> L.

1.2 土壤铅、锌含量测定

采集的土样充分混匀,经风干磨细后,通过 1

mm 筛,留存 1 kg 进行铅锌含量测试分析。测定仪器为 PE-5000 型原子吸收光谱仪,土壤锌和铅的测定分别参照 GB/T 17138-1997^[12]和 GB/T 17141-1997^[13]的方法进行。取不同采样点的平均值代表尾矿区域铅锌的污染状况。

1.3 不同菌株耐重金属性测定

以土壤铅锌含量测定结果为依据,在灭过菌的 YMA 培养基中加入 0.1 mol·L⁻¹的 ZnSO₄·7H₂O 和 Pb(C₂H₃O₂)·3H₂O 母液,分别制成含不同浓度的单盐与双盐重金属选择性培养基平板。铅盐浓度依次是 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mmol·L⁻¹; 锌盐浓度依次是 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mmol·L⁻¹; 双盐浓度设计如表 3。

表 3 测试双盐耐性的铅、锌双盐浓度梯度/(mmol·L⁻¹)
Table 3 Concentrations of lead and zinc salt for the test of double salt tolerance

重金属类型 Heavy metal	浓度梯度 Concentration				
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Pb ²⁺	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Zn ²⁺	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0

单盐试验:采用多点接种法,将活化的供试菌接种于含有不同单盐浓度的重金属选择性平板上,每个处理设 3 个重复,以不添加重金属的 YMA 平板作为阳性对照,28℃ 下培养观察 3~10 d,生长记为“+”,不生长记为“-”。

双盐试验:将供试菌株接种于含有铅和锌的双盐重金属选择性培养基平板上,并以不添加重金属的 YMA 培养基平板作为阳性对照,接种、培养、观察记录同单盐试验。

1.4 生理生化实验

生理生化实验参照沈萍等的方法进行^[14],实验内容包括对所有供试菌株进行 6 项生理生化指标的测定,6 项实验分别是淀粉水解、明胶液化、油脂水解、甲基红(M.R.)实验、乙酰甲基甲醇(V.P.)实验和吲哚实验,观察记录与上述相同。

2 结果与分析

2.1 尾矿区土壤重金属含量分析

从商州铅锌尾矿区土壤铅锌含量测定结果可以看出(表 4),铅锌尾矿区土壤中重金属 Zn 的含量大于 Pb,以陕西省土壤铅锌背景值^[15]为参照,分别是其 55.79 倍和 123.48 倍。说明尾矿区铅和锌含量很高,污染情况比较严重,必须修复改良。

表 4 商州铅锌尾矿区土壤的铅、锌含量/(mg·kg⁻¹)
Table 4 Soil lead and zinc contents in the tailing area of lead-zinc mine in Shangzhou

项目 Items	Pb	Zn
商州铅锌尾矿区土壤铅锌平均含量(A) Average content in the tailing area of lead-zinc mine in Shangzhou	2531.37±438.46	3671.14±463.18
陕西省土壤铅锌背景平均值(B) Average content in soil of Shaanxi Province	20.5	65.8
商州铅锌尾矿区铅锌含量同陕西省土壤背景值的比值 Ratio of A to B	123.48	55.79

2.2 不同菌株对重金属的耐受能力分析

2.2.1 不同菌株耐单盐胁迫性能比较 从表 5 可以看出,从尾矿区自然生长的豆科植物中分离的大多数菌株对铅、锌重金属都具有耐性。在浓度为 2.0 mmol·L⁻¹的铅盐和锌盐胁迫下分别有 10、11 株菌能生长(各占总菌数的 83% 和 92%);在浓度为 3.0 mmol·L⁻¹的铅盐和锌盐胁迫下分别有 8 株和 10 株菌能生长(各占总菌数的 67% 和 83%);在浓度为 4.0 mmol·L⁻¹的铅盐和锌盐胁迫下分别有 6 株和 8 株菌能生长(各占总菌数的 50% 和 67%);在 5.0 mmol·L⁻¹的铅盐胁迫下菌株 CH3、MX7、HZ10 能生长,在 5.0 mmol·L⁻¹的锌盐胁迫下菌株 CH3、MX6、MX7、HZ10 能生长,在 6.0 mmol·L⁻¹的锌盐胁迫下菌株 CH3、MX7 仍能生长。可见菌株 CH3、MX7、HZ10 对铅、锌胁迫具有强的耐性。总体看来,各菌株对锌的耐受能力大于对铅的耐受能力,随着铅锌浓度的增大,耐性菌株数逐渐减少。

2.2.2 不同根瘤菌菌株对双盐胁迫的响应 根据表 6 测试结果,在 C₁ 双盐[1.0 mmol·L⁻¹铅 + 2.0 mmol·L⁻¹锌]胁迫下有 83% 的菌株能够生长,在 C₂ 双盐[2.0 mmol·L⁻¹铅 + 3.0 mmol·L⁻¹锌]胁迫下有 58% 的菌株能够生长,而在 C₃ 双盐[3.0 mmol·L⁻¹铅 + 4.0 mmol·L⁻¹锌]胁迫下有 25% 的菌株能够生长,这表明来自尾矿区豆科植物的根瘤菌菌株对铅、锌双盐胁迫也具有一定的耐性。其中铅锌高耐性菌株为菌株 CH3 与 MX7,可以耐受双盐胁迫的浓度为 C₄[4.0 mmol·L⁻¹铅 + 5.0 mmol·L⁻¹锌];其次是根瘤菌 HZ10,耐受双盐胁迫的浓度为 C₃[3.0 mmol·L⁻¹铅 + 4.0 mmol·L⁻¹锌]。但菌株在铅、锌双重胁迫下的生长状况明显不如铅、锌单独胁迫下的生长状况,说明铅与锌胁迫对根瘤菌的生长抑制作用具有累加

效应。Carrasco 等^[16]从黄铁矿溢出污染区分离获得 41 株根瘤菌菌株,测出它们对 Pb^{2+} 的耐性浓度为 $2.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。聂湘平等^[17]研究了大叶相思的根瘤菌,发现在 Zn^{2+} 胁迫浓度小于 $10.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时

仍有可以耐受的菌株。同前人的研究结果相比较,本实验中分离到的 3 株高耐受性菌株 CH3、MX7 与 HZ10 对 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 的抗性是比较显著的,具有潜在的开发应用价值。

表 5 不同 Pb、Zn 单盐浓度下 12 株根瘤菌的生长													
Table 5 Growth of 12 rhizobium strains under various concentrations of single Pb and Zn salt													
菌株 Strain	对照 CK	单铅浓度梯度/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$ Concentration gradient of single Pb salt						单锌浓度梯度/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$ Concentration gradient of single Zn salt					
		2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
CH1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CH2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CH3	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
MX4	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MX5	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
MX6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
MX7	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
HZ8	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
HZ9	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
HZ10	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
CM11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM12	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

表 6 不同铅锌双盐浓度下 12 株根瘤菌的生长						
Table 6 Growth of 12 rhizobium 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 rhizobium strains under Pb-Zn double salt stress				
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
CH1	+	+	-	-	-	-
CH2	+	+	-	-	-	-
CH3	+	+	+	+	+	-
MX4	+	+	+	-	-	-
MX5	+	+	+	-	-	-
MX6	+	+	+	-	-	-
MX7	+	+	+	+	+	-
HZ8	+	+	+	-	-	-
HZ9	+	-	-	-	-	-
HZ10	+	+	+	+	-	-
CM11	+	+	-	-	-	-
CM12	+	-	-	-	-	-

2.3 生理生化指标及与耐性的关系分析

从供试菌株生理生化指标的测定结果(表 7)可以看出,商州铅锌尾矿区的豆科植物不同根瘤菌菌株在生理生化性质上的表现呈多样性。在 6 项指标中,3 株耐铅锌能力强的根瘤菌株 CH3、MX7 与 HZ10 出现了较多的阳性结果,都能分解淀粉、明胶、油脂和糖类物质,说明根瘤菌较强的耐铅锌胁迫能

力可能是因为它们具有多样化的代谢途径,当受到胁迫时它们可以在不同的代谢途径中进行选择而不会被抑制。而其余 9 株菌在生理生化性质上表现出的阴性结果较多,只能单一地对淀粉、明胶、油脂和糖类进行分解利用,由于代谢类型少,这样在铅锌胁迫下就缺少代谢的选择性而容易受到抑制。据此可以推测菌株耐铅锌胁迫的能力与生理生化代谢指标之间应存在一定的相关性。前人的研究曾指出细胞是通过代谢途径发生变化来增加抗逆性,适应环境的^[18],这一推测与前人的结论是一致的。另外本研究也启示我们,对抗重金属的根瘤菌的初步筛选可以结合生理生化特性作为参考指标。

3 结论与讨论

本研究从陕西商州铅锌尾矿区既存豆科植物中分离的 12 株根瘤菌对铅、锌重金属胁迫均表现出一定的耐性。铅锌双盐胁迫对根瘤菌的抑制毒害作用大于其单盐效应。高耐性菌株均具有较强的分解利用淀粉、蛋白胨、油脂和糖类物质的能力,说明根瘤菌对重金属的耐性可能与其具有多样化的代谢途径有关,它们可以通过改变代谢途径适应重金属污染的环境。通过单盐胁迫和双盐胁迫模拟实验从分离到的菌株中筛选出了 CH3、MX7 与 HZ10 这 3 株对铅锌具有高耐性的菌株,它们分别与豆科植物刺槐、天

蓝苜蓿和多花胡枝子共生。可见自然生长于铅锌尾矿区的不同豆科植物上都有耐性较强的根瘤菌与之共生,但其耐性强弱和生化特性并不完全相同。

表 7 根瘤菌的生理生化指标测定结果
Table 7 Physiological and biochemical characteristics of rhizobium strains

菌株 Strain	淀粉 水解 Starch hydrolysis	明胶 液化 Gelatin liquefaction	油脂 水解 Fat hydrolysis	M. R. 实验 M. R. experiment	V. P. 实验 V. P. experiment	吡唑 实验 Indole test
CH1	-	+	-	-	-	-
CH2	+	-	-	-	-	-
CH3	+	-	-	+	+	+
MX4	+	-	-	-	-	-
MX5	+	-	-	-	+	-
MX6	+	+	+	-	-	+
MX7	-	-	+	-	-	-
HZ8	+	+	+	-	+	+
HZ9	-	-	-	-	+	-
HZ10	+	+	-	-	-	-
CM11、	+	-	+	-	+	-
CM12	+	+	+	-	+	+

同陕西省土壤重金属含量背景值相比,商州铅锌尾矿区铅、锌元素含量较高,污染比较严重,对尾矿区的植物调查表明,刺槐、天蓝苜蓿和多花胡枝子这 3 种豆科植物在重金属尾矿污染区仍能生长且数量较多,并未表现出严重的重金属毒害现象,可能与其根部共生的根瘤菌有密切关系,根瘤菌能吸附重金属并对其进行形态转化,从而降低重金属对植物的毒性。本实验对这些共生根瘤菌进行的耐铅锌胁迫和生理生化特性研究发现,从自然生长于尾矿区的豆科植物中分离的大多数根瘤菌对铅、锌重金属胁迫均具有良好的耐性,但菌株在铅、锌双重胁迫下的生长状况弱于铅、锌单独胁迫下的生长,说明铅锌胁迫对根瘤菌的生长抑制作用具有累加效应。供试菌株生理生化指标测验结果说明根瘤菌对铅锌耐性可能与生理代谢广泛性有关,这些启示我们可以把生理生化特性作为初步筛选抗铅锌根瘤菌的一个参考指标。

对于土地十分贫瘠的山区来说,在尾矿区植被恢复初期,若能将抗重金属能力较强的根瘤菌接种到豆科植物上,使之形成强大的共生固氮体系,不仅可以增强豆科植物的抗逆性(如干旱、重金属胁迫等),而且因这种体系能长期固定空气中的氮,所以将会增加尾矿区土壤中的氮素营养,提高土壤肥力,为后期其它植物的引入和定植创造条件,使尾矿区生态得以恢复和保持。利用“豆科植物-根瘤菌”共

生体系来修复重金属尾矿区的污染土地和废弃地具有广阔的应用前景,值得进一步深入研究和推广。

参 考 文 献:

[1] 牛之欣,孙丽娜,孙铁珩.重金属污染土壤的植物-微生物联合修复研究进展[J].生态学杂志,2009,28(11):2366-2373.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Izquierdo I, Caravaca F, Alguacil M M, et al. Use of Microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions[J]. Applied Soil Ecology, 2005,30:3-10.

[5] Zhang C B, Huang L N, Wong M H, et al. Characterization of soil physico-chemical and microbial parameters after revegetation near shaoguan Pb/Zn smelter, Guangdong, P. R. China[J]. Water Air and Soil Pollution, 2006,177:81-101.

[6] 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.

[7] 冀玉良,李堆淑,赵龙飞,等.陕西商洛部分地区刺槐根瘤菌的遗传多样性和系统发育[J].农业生物技术学报,2013,21(11):1373-1383.

[8] 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.

[9] 束文圣,叶志鸿,张志权,等.华南铅锌尾矿生态恢复的理论与实践[J].生态学报,2003,23(8):16291-1639.

[10] 霍伟,蔡庆生.植物促生菌提高植物重金属耐受性研究进展[J].微生物学通报,2010,37(9):13741-1378.

[11] 龚秀会,缪福俊,赵平.云南东川铜矿区豆科植物-根瘤菌对铜的耐受性[J].江苏农业科学,2012,40(6):3121-314.

[12] 中国环境监测总站.GB/T 17138-1997.土壤质量 铜、锌的测定 火焰原子吸收分光光度法[S].北京:中国标准出版社,1998.

[13] 中国环境监测总站.GB/T 17141-1997.土壤质量 铅、镉的测定 石墨炉原子吸收分光光度法[S].北京:中国标准出版社,1998.

[14] 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.

[15] 陆书玉,栗胜基,朱坦.环境影响评价[M].北京:高等教育出版社,2006:161-162.

[16] Carrasco J A, Arnario P, Pajuelo E, et al. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005,37:1131-1140.

[17] 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.

[18] 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.