

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.01.022

# 桐花树根部一株内生固氮菌的筛选 及其培养特性研究

蔺红苹, 谢呈媛, 王 芸, 成夏岚\*

(岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

**摘要:** [目的] 为了解红树植物根部内生微生物的固氮功能和获得固氮能力较高的固氮菌, 本实验从红树植物-桐花树根部组织分离纯化得到具有固氮能力的菌株。[方法] 以 Ashby 无氮培养基为选择分离条件, 从表面消毒的植物根部组织分离得到内生固氮菌, 并通过凯氏定氮法检测菌株的固氮能力; 采用单因素法优化培养条件, 获得菌株典型生长曲线。[结果] 实验筛选得到固氮能力较高的一株固氮菌 A<sub>1</sub>, 从形态学特征等方面进行研究, 为革兰氏阴性菌, 菌落圆形乳白色, 菌株固氮量为 16.695 mg·L<sup>-1</sup>, 最适生长条件: 温度 32℃, pH 值 7, NaCl 浓度 2%, 最适碳源淀粉。[结论] 本实验为培育优良的红树植物内生固氮菌与研制高效固氮菌剂应用于生产实践提供理论依据。

**关键词:** 内生固氮菌; 筛选; 培养特性

**中图分类号:** S718.8

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2021)01-0181-06

桐花树 (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco) 生长在海岸潮间带, 其林带生境受潮水的周期性浸淹, 有多变的盐度、高温和强紫外等特殊环境因素, 由此也创造了丰富的微生物群落。植物内生固氮菌是指定殖于植物体内, 不损害植物健康<sup>[1]</sup>, 并且能与宿主植物进行联合固氮的一类固氮微生物, 属于植物微生物生态系统的天然组分。植物内生固氮菌于植物体内定殖, 生活在植物细胞内、木质部导管、细胞间隙等部位, 并进行固氮作用。内生固氮菌在植物体组织内占据着有利于营养供应与微环境适宜的生态位, 可有效地拮抗许多病原微生物的生长<sup>[2]</sup>, 提高作物抗性, 较根际、叶际等附生环境更有利于与植物形成高效的固氮体系, 行使其固氮功能为宿主植物提供氮素, 进而促进植物的生长和产量的提高, 是一类应用前景广泛、尚待开发的微生物资源<sup>[3]</sup>。

本研究从湛江海滩桐花树根部取材, 通过分离纯化固氮菌, 分析其固氮能力, 初步筛选出固氮能力较好的优良固氮菌, 并对其培养条件进行了优化, 旨在培育优良红树植物内生固氮菌、研制固氮菌剂, 以期应用于红树林育苗造林的生产实践中, 为沿海防护林体系建设提供理论依据, 对保护红树林生态系统具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

于广东省湛江市海滨公园观海长廊红树林滩涂, 随机选取桐花树植株 5 株, 采集无病虫害、长势良好的桐花树植株的根部根皮组织, 用于分离菌株。

### 1.2 内生固氮菌的分离和纯化

根部组织样品用自来水冲洗干净, 用吸水纸吸

收稿日期: 2020-01-09 修回日期: 2020-11-04

基金项目: 岭南师范学院实验室安全建设与管理专项项目; 国家星火计划 2012GA780021 项目资助

\* 通讯作者: 成夏岚, 主要研究方向为植物生态及功能性研究. E-mail: 82895497@qq.com

干表面水分后称取 5 g, 无菌水冲洗 3~4 次后, 用 75% 乙醇浸泡消毒 5~7 min, 2% 次氯酸钠进行表面消毒 10~20 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 取最后一次的冲洗液 0.1 mL, 涂布于无菌的牛肉膏蛋白胨培养基平板进行无菌检验。样品加入 50 mL 无菌水放在无菌研钵中进行研磨, 静止 10~15 min 后, 取 0.1 mL 研磨液涂布于 Ashby 无氮培养基平板, 实验设 3 次重复, 放在 28℃ 恒温培养箱中黑暗培养 72 h<sup>[4]</sup>。根据菌落颜色、形态等挑选单菌落, 分别在 Ashby 无氮培养基平板上再次划线, 直到获得纯培养物, 最后转接至 Ashby 无氮培养基斜面保存备用。

将已经纯化的菌株接种到 Ashby 无氮培养基平板中培养 3 d, 观察菌落大小、形态、表面和颜色等特征, 然后进行革兰氏染色。

### 1.3 凯氏定氮法检测固氮能力

参考文献 [5-7] 的方法, 对菌株的固氮能力进行测定。

将各菌株接种到装有 100 mL 无氮液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 28℃、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下振荡培养 4 d。量取培养好的菌液样品 10 mL、硫酸铜和硫酸钾的混合物 (比例为 1:6) 0.5 g、浓硫酸 10 mL 和 2 粒瓷碎片, 移入凯氏烧瓶中, 在通风橱内, 以 45° 斜于电磁炉上隔石棉网加热, 烧至液体变成蓝绿色透明后, 取下冷却, 转移到 25 mL 容量瓶, 加水定容。

吸取 2% 硼酸溶液 10 mL 于锥形瓶中, 加 2 滴溴甲酚绿-甲基红混合指示剂, 将冷凝管下端放置于硼酸液面之下。水蒸气发生瓶内装水到 2/3 容积处, 量取消化样品 5 mL 经小漏斗加入到反应管内, 用少量蒸馏水洗下, 再加入浓度 40% 的氢氧化钠 10 mL, 加上少量水于漏斗密封。酒精灯加热发生瓶蒸馏, 至指示剂变绿色后继续蒸馏 5 min, 冷凝管脱离硼酸液面后再蒸馏 2 min, 用蒸馏水冲洗管壁, 取下装有硼酸的锥形瓶, 每样品蒸馏重复 3 次。吸取 10 mL 空白消化液, 按上述样品操作步骤操作, 作为空白对照。用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸标准溶液将锥形瓶内的硼酸溶液滴定至终点, 变成浅灰红色, 记录盐酸的用量, 并计算样品含氮量 (mg·L<sup>-1</sup>)。

### 1.4 菌株生长培养条件

1.4.1 接菌量 将在 28℃、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养好的菌悬液按 2% 的接种量接种到试验所用的培

养基中。

1.4.2 pH 值 配制 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 LB 液体培养基各 50 mL 备用。无菌条件下, 将菌悬液接种于各 pH 值液体培养基中, 摇匀, 28℃、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 24 h 后, 测定其在  $OD_{600}$  下的吸光值, 以不接菌的 LB 培养基为空白对照, 实验设 3 次重复。培养 48 h 后再测定 1 次  $OD_{600}$  吸光值<sup>[8]</sup>。 $OD_{600}$  吸光值大, 表明菌株生长旺盛, 反之亦然。

1.4.3 NaCl 浓度 在 pH 值为 7 的 LB 液体培养基中分别加入浓度 0%、1%、2%、3%、4% 的 NaCl, 各 50 mL 装于 250 mL 锥形瓶中, 每浓度设 3 次重复, 灭菌后备用。无菌操作下, 将菌悬液接种于不同 NaCl 浓度的 LB 液体培养基中, 28℃、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 24、48 h 后分别测定  $OD_{600}$  吸光值。

1.4.4 温度 无菌条件下, 将菌悬液接种于 pH 值为 7 的 LB 液体培养基中, 分别置于 20、24、28、32、36℃ 下 180 r·min<sup>-1</sup> 培养, 每温度 3 次重复, 以不接菌的为对照, 培养 24、48 h 后, 测定  $OD_{600}$  吸光值。

1.4.5 碳源 配制分别由乳糖、蔗糖、淀粉、葡萄糖、麦芽糖代替 LB 液体培养基中的碳源 (酵母膏) 的液体培养基各 50 mL, 装于锥形瓶中灭菌备用。无菌条件下, 菌悬液接种于 5 个不同碳源的 pH 值为 7 的 LB 液体培养基中, 摇匀, 32℃、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 24、48 h 后分别测定菌株  $OD_{600}$  吸光值。

### 1.5 菌株生长曲线的测定

将活化后的菌株接种于装有 100 mL 的 LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 培养 12 h, 作为菌种。将菌种接种于分装有 50 mL pH 值为 7、NaCl 浓度为 2% 的 LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 分别标记为 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h, 每处理设 3 次重复, 除 0 h 处理组外, 立即将其余的试验瓶放置于 32℃ 培养箱中培养, 每隔 4 h 取出对应编号的锥形瓶菌液, 以 0 h 的处理组作为空白对照, 紫外分光光度计在 600 nm 的波长下测定不同培养时间菌液的  $OD_{600}$  吸光值。以测得平均  $OD_{600}$  吸光值为纵坐标, 对应培养时间为横坐标, 绘制菌株的生长曲线。

### 1.6 数据处理

数据使用 SPSS Statistics 20.0 (IBM, Chicago, USA)、Excel 2010 统计软件进行统计分析, 采

用单因素方差分析进行均值显著性检验, 邓肯多重比较进行显著性差异检验 ( $P < 0.05$ ), 使用 SigmaPlot13.0 进行绘图, 所示数据为 3 次重复的平均值  $\pm$  标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 固氮菌的分离与形态学特征

通过 Ashby 无氮培养基选择分离培养后, 从红树植物桐花树根部分离得到 3 株能在无氮培养基上生长的菌株, 分别用 A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、C<sub>1</sub> 表示。经过 4 代的分离纯化后, 分别进行革兰氏染色, 确定 3 种菌皆为革兰氏阴性菌 (Gram negative bacillus)。通过凯氏定氮法筛选得到高效固氮能力的菌株 A<sub>1</sub> (图 1), 其形态学特征: 球状菌, 乳白色, 菌落圆形, 表面光滑, 湿润, 边缘整齐。

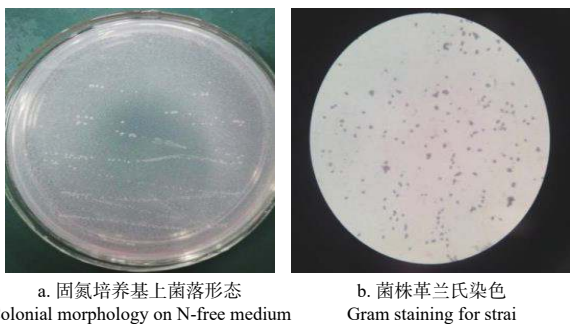


图 1 分离的固氮菌株 A<sub>1</sub>

Fig. 1 Isolated nitrogen fixation strain A<sub>1</sub>

### 2.2 固氮菌的固氮能力测定与筛选

分离得到的菌株通过连续传代培养后, 用微量凯氏定氮法测定菌体固氮量。由表 1 可知: 所得菌株都具有一定的固氮能力, 其中, 菌株 A<sub>1</sub> 固定的氮量相对较高, 达  $16.695 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且生长状况比其他 2 株好。综合评价细菌的固氮量和生长情况, 筛选出高效菌株 A<sub>1</sub>。

表 1 菌株的生长状况 ( $OD_{600}$  值) 和固氮量

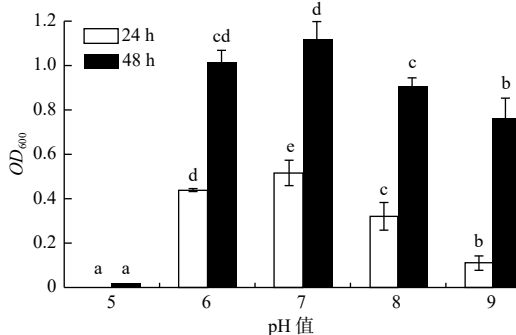
Table 1 The growth status of the strain ( $OD_{600}$  value) and the amount of nitrogen fixation

菌株 Strains	平均 $OD_{600}$ Average $OD_{600}$	固氮量 N fixed/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
A <sub>1</sub>	$0.051 \pm 0.006$	$16.695 \pm 0.448$
B <sub>1</sub>	$0.012 \pm 0.003$	$10.899 \pm 0.290$
C <sub>1</sub>	$0.015 \pm 0.002$	$4.914 \pm 0.236$

### 2.3 固氮菌的最适培养条件

#### 2.3.1 pH 值对菌株生长的影响 pH 值对菌株 A<sub>1</sub>

的生长影响显著 ( $P < 0.05$ ) (图 2), 菌株 A<sub>1</sub> 的 pH 值适应范围较广, 在 pH 值 5~9 范围内其生长速率随 pH 值的增大呈先增大后减小的趋势, 且培养 24 h 和 48 h 时菌株 A<sub>1</sub> 液体培养基的  $OD_{600}$  吸光值都在 pH 值为 7 时达到最大值; 在 pH 值为 6~8 内生长较好, 且在 pH 值为 6 时 (24 h,  $OD_{600}$  吸光值为 0.439; 48 h,  $OD_{600}$  吸光值为 1.012) 比 pH 值为 8 时 (24 h,  $OD_{600}$  吸光值为 0.320; 48 h,  $OD_{600}$  吸光值为 0.904) 生长状况好, 说明菌株 A<sub>1</sub> 是中性偏酸菌。

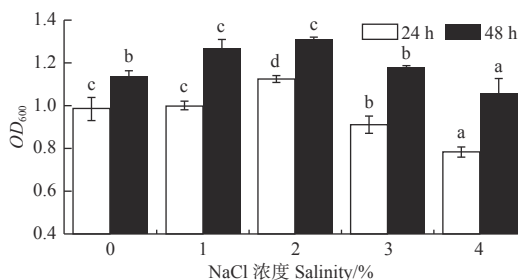


注: 不同小写字母表示同时间不同 pH 值下菌株生长差异显著 ( $P < 0.05$ )  
Note: different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) of Strain growth With time under different pH

图 2 pH 值对菌株生长的影响

Fig. 2 Effects of different pH on strain growth

2.3.2 NaCl 浓度对菌株生长的影响 NaCl 浓度对菌株 A<sub>1</sub> 的生长影响显著 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。菌株在 0%~4% 的 NaCl 浓度下均能生长, 说明菌株对 NaCl 浓度有较广的适应性; 在 NaCl 浓度为 1%、2% 时, 菌株 A<sub>1</sub> 24 h 生长量  $OD_{600}$  吸光值分别为 0.997 和 1.123, 菌株 A<sub>1</sub> 48 h 生长量  $OD_{600}$  吸光值分别为 1.265 和 1.309。由此可见, 该菌株的



注: 不同小写字母表示同时间不同 NaCl 浓度下菌株生长差异显著 ( $P < 0.05$ )

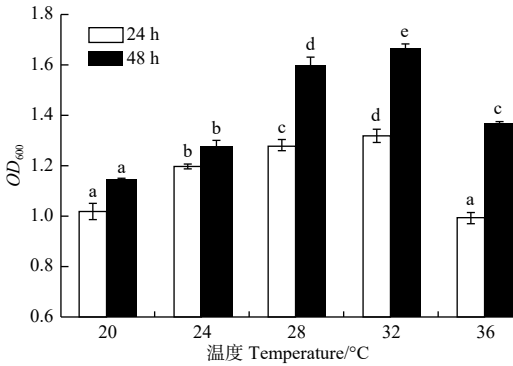
Note: different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) of Strain growth With time under different NaCl salinity

图 3 NaCl 浓度对菌株生长的影响

Fig. 3 Effects of different NaCl salinity on strain growth

最佳 NaCl 浓度为 2%，较为适宜的 NaCl 浓度为 1%~2%。

**2.3.3 温度对菌株生长的影响** 温度对菌株 A<sub>1</sub> 生长的影响显著 (图 4,  $P < 0.05$ )。菌株 A<sub>1</sub> 在 20~36℃ 均可生长; 在 20~32℃ 时, 随温度升高, 菌株生长量逐渐增加; 在 32℃ 时, 菌株 A<sub>1</sub> 生长量达到最大 (24 h,  $OD_{600}$  吸光值为 1.318; 48 h,  $OD_{600}$  吸光值为 1.666); 在 32℃ 之后, 生长量开始下降。32℃ 为该菌的最佳生长温度, 而它的最适温度为 28~32℃。

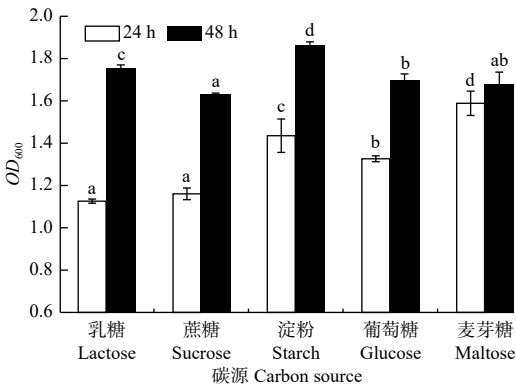


注: 不同小写字母表示同时间下不同温度菌株生长差异显著 ( $P < 0.05$ )  
Note: different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) of Strain growth with time under different temperature

图 4 温度对菌株生长的影响

Fig. 4 Effects of temperature on strain growth

**2.3.4 碳源对菌株生长的影响** 碳源对菌株生长的影响差异显著 (图 5,  $P < 0.05$ )。菌株 A<sub>1</sub> 对各碳源乳糖、蔗糖、淀粉、葡萄糖、麦芽糖均能利用, 生长普遍较好; 培养 24 h 时, 菌株对麦芽糖的利用



注: 不同小写字母表示同时间下不同碳源菌株生长差异显著 ( $P < 0.05$ )  
Note: different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) of Strain growth with time under different carbon source

图 5 碳源对菌株生长影响的影响

Fig. 5 Effects of carbon source on strain growth

率较高, 生长量较大 ( $OD_{600}$  吸光值为 1.587); 48 h 内, 菌株对淀粉的利用率更高和持久, 生长量达到最大 ( $OD_{600}$  吸光值为 1.861), 因此, 长时间培养可用淀粉做其碳源。

## 2.4 菌株生长曲线的绘制

菌株 A<sub>1</sub> 的典型生长曲线见图 6。菌株接种后, 经过 0~4 h 的延迟期, 在 4~20 h 进入了快速生长的对数期, 20 h 之后到达稳定期, 维持 12 h 后, 在 32 h 后开始进入缓慢的衰亡期。说明筛选出的菌株 A<sub>1</sub> 有一个完整的生长过程, 包括了延迟期、对数期、稳定期和衰亡期, 生长周期相对较长。

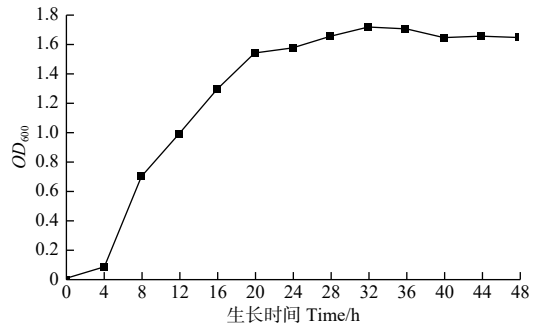


图 6 高效菌株的生长曲线

Fig. 6 Typical growth curve of strain

## 3 讨论

无氮液体培养基中菌株生长繁殖所需要的氮源全部来于对氮气的固定, 刘欣林<sup>[9]</sup>用凯氏定氮法测得不同小麦内生固氮菌的固氮量分别为 3.6、3.0、2.8、2.7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 栾敏<sup>[10]</sup>用凯氏定氮法测得土壤自生固氮菌的固氮量分别为 4.0、3.0、2.7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 本实验用凯氏定氮法测得试验菌的固氮量为 16.695  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 显示出良好的固氮性能; 而杨从发等<sup>[11]</sup>取小麦、水稻、玉米和蔬菜根际土壤测得的自生固氮菌的固氮量从 13.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  到 72.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  不等, 说明取材地点对固氮菌的固氮量影响较大。杨从发等<sup>[11]</sup>通过乙炔还原法和凯氏定氮法比较了自生固氮菌的固氮能力, 结果表明, 2 种方法都能很好的测定固氮酶活性。红树林内生固氮菌在红树林生态系统的恢复、可持续发展以及红树植物的保育和繁殖方面应用前景广阔<sup>[12]</sup>。然而, 开发固氮资源还需要做进一步的研究, 比如接种固氮剂到作物上, 评估接种对作物生长的影响等。

培养液中不同 pH 值对菌体的生产量影响较

大,在 pH 值  $\leq 5$  的培养液中,菌株不能正常生长,培养液中的 pH 值对细菌代谢产物的解离有影响,引起细胞膜的电荷变化,从而影响细菌对营养物质的吸收利用。此外, pH 值还影响酶的合成,导致影响细菌对物质的分解利用效率; pH 值过高或过低都不利于细菌的生长和代谢物质的产生,从而影响细菌的固氮能力<sup>[13]</sup>。菌株 A<sub>1</sub> 在  $5 < \text{pH} \leq 9$  的培养条件下均能生长,说明该菌株具有较强的适应能力。侯伟等<sup>[14]</sup>认为,广东籼竹内生固氮菌在 pH 值 5~8 时,生长势较强,与本研究结果一致,也与葛江丽<sup>[15]</sup>等对水稻根际固氮菌的 pH 值适应范围一致。

NaCl 在维持渗透压方面起重要作用, Na<sup>+</sup>和 Cl<sup>-</sup>是维持细胞外液渗透压的主要离子。目前,关于渗透压影响固氮菌生长和功能的研究较少,因为细菌的有关耐盐机理较复杂,多数认为细菌可合成或积累一些“亲和性溶质”的有机化合物,这些有机化合物在细菌体内迅速合成和分解,对于不同的盐浓度环境有很好的适应作用。本试验菌株 A<sub>1</sub> 在 NaCl 浓度为 2% 时,生长量最大,与侯伟等<sup>[14]</sup>对广东籼竹内生竹内生固氮菌在 NaCl 浓度为 0.5~2.5 g·L<sup>-1</sup> 时能保持旺盛生长且固氮酶活性较强的研究结论一致。本试验菌株在 NaCl 浓度 0%~4% 的条件下均能较好地生长。

低温时,细胞的酶活性较低,对营养物质的利用能力较弱,进而影响生物的生长;随着温度升高,酶活性升高,对营养物质利用加快,提高了细菌生长分化速度;超过一定温度时,酶会逐渐失活,导致细菌减少甚至死亡。本研究菌株最适宜温度为 32℃,在此温度可以达到细菌生长的较高水平;28~32℃ 时,菌株生长势较强。刘彩霞等<sup>[16]</sup>认为,杉木林土壤中固氮菌的适宜生长温度为 28℃,较为适宜生长区的温度为 20、28、37℃;侯伟等<sup>[14]</sup>认为,广东籼竹内生固氮菌在 26~37℃ 时,菌液 OD<sub>600</sub> 吸光值和固氮酶活性都维持在较高水平,温度偏高于本研究结果。笔者认为,红树根部长期处于海水的浸泡中,温度低于陆地上温度,适宜温度略低于陆地植物内生菌是长期适应的结果。

碳源是细胞生命活动所需的重要能量来源,同时提供合成产物的碳架。在微生物的培养中,碳源为微生物的正常生长和分裂提供了物质基础。本

实验中,菌株 A<sub>1</sub> 在对碳源的长期利用中,淀粉的供能利用效果更好,淀粉也是植物光合作用的主要产物。

## 4 结论

本研究从湛江海滩桐花树根部获得 1 株高效固氮菌,对其培养条件进行了优化,结果表明,其最适生长条件为:温度 32℃, pH 值 7, NaCl 浓度 2%,最适碳源淀粉。本实验为培育优良的红树植物内生固氮菌与研制高效固氮菌剂应用于生产实践提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] 叶文雨,谢序泽,杨林青,等. 巨菌草一株内生固氮菌的分子鉴定及生物学特性[J]. 热带农业科学, 2018, 38(12): 69-74.
- [2] 黄淑芬, 郜晨, 刘丽辉, 等. 植物内生固氮菌系统发育进化新进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 181-190.
- [3] 刘丽辉, 彭桂香, 黄淑芬, 等. 落地生根内生固氮菌多样性和促生特性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2538-2547.
- [4] 管岑澜, 唐梅, 张智锦, 等. 豆科植物内生固氮菌的分离与筛选[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 70-71.
- [5] 张泽泉, 罗翠婷, 李孔寿, 等. 凯氏定氮法蛋白质测定的改进探讨[J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(1): 64-66.
- [6] 王金灿. GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》之 5.1 凯氏定氮法具体操作疑难解析[J]. 食品安全导刊, 2018(30): 54-55.
- [7] 王聪, 凌娟, 张燕英, 等. 海洋固氮菌和解磷菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 817-829.
- [8] 彭玉红, 焦如珍, 牟新涛. 尖峰岭抗逆性根瘤菌的筛选及其 16SrDNA 序列的测定[J]. 林业科学研究, 2010, 23(4): 530-536.
- [9] 刘欣林. 小麦内生固氮菌的筛选与鉴定[D]. 成都: 四川师范大学, 2013.
- [10] 栾敏. 土壤自生固氮菌的分离鉴定及生物固氮与促进植物生长效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [11] 杨从发, 王淑军, 陈静, 等. 自生固氮菌的分离鉴定[J]. 淮海工学院学报, 1999, 8(3): 56-58.
- [12] 凌娟, 董俊德, 张燕英, 等. 一株红树林根际固氮菌的分离、鉴定以及固氮活性测定[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 149-153.
- [13] 刘青海, 姚拓, 马从, 等. 6株溶磷菌和4株固氮菌混合培养条件的研究[J]. 草原与草坪, 2011, 31(6): 1-6, 13.
- [14] 侯伟, 彭桂香, 许志钧, 等. 广东籼竹内生固氮菌生理特性及促生效果研究[J]. 林业科学研究, 2008, 21(1): 101-105.
- [15] 葛江丽, 施汉钰, 刘桂棋, 等. 水稻根际固氮菌分离及最适培养条件研究[J]. 东北农业科学, 2018, 43(4): 53-56.
- [16] 刘彩霞, 赵京京, 焦如珍. 杉木林土壤中固氮功能细菌的生长特性研究[J]. 林业科学研究, 2018, 31(4): 98-103.

# Screening of Endophytic Nitrogen Fixation Bacteria from Roots of *Aegiceras corniculatum* and Optimization of Their Culture Conditions

LIN Hong-ping, XIE Cheng-yuan, WANG Yun, CHENG Xia-lan

(School of Life Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong, China)

**Abstract:** [Objective] To understand the nitrogen fixation function of the endophytic microorganisms in the roots of mangrove plants and obtain nitrogen-fixing bacteria with higher nitrogen fixation ability by isolating the nitrogen-fixing strains and purifying them from root tissues of mangrove plants. [Method] The Ashby nitrogen-free medium was selected as separation condition, and the endophytic nitrogen-fixing bacteria were isolated from surface of surface-sterilized plant roots, then the nitrogen-fixing ability of the strain was determined by Kjeldahl method. The monofactor method was used to optimize the culture conditions, and typical growth curve of strain was obtained. [Result] The results showed that a strain of nitrogen-fixing bacterium A<sub>1</sub> with high nitrogen-fixing ability was selected as Gram-negative bacterium, and its colony was round milky white, the nitrogen fixation rate of the strain was 16.695 mg·L<sup>-1</sup>. Its optimum growth conditions were temperature 32°C, pH 7, NaCl concentration 2%, and the optimum carbon source was starch. [Conclusion] This experiment can provide a theoretical reference for the cultivation of excellent mangrove nitrogen-fixing bacteria and the development of high-efficiency nitrogen-fixing bacteria.

**Keywords:** endophytic nitrogen fixation bacteria; screen; culture characteristics

(责任编辑: 徐玉秀)