

## TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN *Azotobacter chroococcum* CÓ HOẠT TÍNH CỐ ĐỊNH ĐẠM

Phạm Thị Duy Anh<sup>1\*</sup>, Hoa Trương Minh Hiếu<sup>1</sup>, Trần Chí Hiếu<sup>2</sup>, Phan Mỹ Hạnh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Phòng Công nghệ Vi sinh - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

*Azotobacter chroococcum* không chỉ đóng vai trò chính trong việc cố định đạm mà còn giữ vai trò quan trọng trong nền nông nghiệp bền vững vì có đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật cũng như sản xuất các tác nhân kiểm soát sinh học chống lại mầm bệnh gây hại trên thực vật. Trong nghiên cứu này, quá trình nuôi cấy thu sinh khối *Azotobacter chroococcum* được tối ưu hóa bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Thực hiện khảo sát đơn yếu tố chọn ra khoảng ảnh hưởng của mỗi yếu tố. Sàng lọc bằng phương pháp Plackett – Burman và chọn ra 3 yếu tố có tác động mạnh nhất là pH, nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  và tỷ lệ nạp giống ( $p < 0,05$ ). Tìm khoảng tối ưu của 3 yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp leo dốc và tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD). Thông số của thành phần và điều kiện môi trường tối ưu cho chủng *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 được xác định: mannitol 0,5%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,15%; peptone 0,15%;  $\text{MgSO}_4$  0,015%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,125%;  $\text{NaCl}$  0,25%;  $\text{FeCl}_3$  0,0005%;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,00025%;  $\text{CaCO}_3$  0,25% (w/v); tốc độ lắc 180 vòng/phút; pH 5,3; nhiệt độ 30°C và tỷ lệ nạp giống 6,68% (v/v) đạt mật độ tối đa là 9,477 log (CFU/mL) sau 24 giờ nuôi cấy, cao hơn 6,67 lần so với môi trường ban đầu TSB là 8,671 log (CFU/mL).

Từ khóa: *Azotobacter chroococcum*, cố định đạm, leo dốc nhất, Plackett – Burman, RSM – CCD.

### MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước sản xuất nông nghiệp lớn vì vậy phân bón là một yếu tố vô cùng quan trọng và không thể thiếu, giúp thúc đẩy năng suất lao động, tăng sản lượng nông nghiệp và nâng cao chất lượng cây trồng. Theo thống kê từ năm 1985 đến nay, mức tiêu thụ phân đạm liên tục gia tăng khoảng 7,2%/năm. Để nâng cao năng suất cây trồng, nông dân đã tăng lượng phân bón gấp 2-3 lần, thậm chí 5-7 lần so với nhu cầu, dẫn đến dư thừa lượng nitrat trong rau, củ, quả. Ngoài ra, việc sử dụng đạm hóa học trong trồng trọt bữa bãi khiến dư thừa nitrat và khi vượt ngưỡng sẽ biến thành nitrit gây nguy hại cho con người, ảnh hưởng tới nguồn gen các loài sinh vật. Đồng thời, phân dư thừa chưa được cây trồng hấp thu sẽ tồn tại trong đất hoặc bị rửa trôi theo nguồn nước và gây ô nhiễm nguồn nước. Trong tình huống như vậy, phân bón sinh học trở thành giải pháp thay thế tốt nhất để duy trì độ phì nhiêu của đất (Bhardwaj *et al.*, 2014). Vi khuẩn cố định nitơ từ khí quyển bằng cách khử nitơ phân tử thành amoniac, chất này tiếp tục được sử dụng để đồng hóa thành các axit amin. Quá trình này được cho là cung cấp 200 triệu tấn đạm mỗi năm (Gosal *et al.*, 2012).

Vì vậy, đề tài cung cấp môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 có khả năng cố định đạm làm tiền đề cho việc sản xuất phân bón sinh học cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, hạn chế ô nhiễm môi trường, hướng đến nền nông nghiệp xanh và tận dụng nguồn đạm có sẵn trong không khí.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 được cung cấp từ Phòng Công nghệ Vi sinh – Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Hóa chất và thiết bị máy móc sử dụng trong nghiên cứu này từ các hãng Himedia, Merck, Carl Zeiss, Mettler Toledo, Memmert, Thermo Fisher Scientific.

#### Phương pháp

##### Xác định mật độ tế bào

Xác định mật độ vi sinh trong mẫu bằng phương pháp pha loãng thập phân.

##### Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối trên môi trường TSB bao gồm: thời gian nuôi cấy (0 - 108 giờ), pH (3 - 11), nhiệt độ (20 - 40°C), tốc độ lắc (150 - 210 vòng/phút), tỷ lệ nạp giống (0,5 - 9%), nguồn cacbon (mannitol, glucose, fructose, sucrose, mật rỉ) và nitơ (peptone, tryptone, yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), nồng độ cacbon (0 - 3,5%) và nitơ (0 - 4%) (Gutiérrez *et al.*, 2011).

Khi khảo sát thí nghiệm đơn yếu tố, cần cố định các yếu tố còn lại ở mức phù hợp, trong trường hợp này chọn mức phù hợp cho toàn bộ thí nghiệm khảo sát như sau: thời gian là 24 giờ, nhiệt độ 30°C, pH 7, tốc độ lắc 180 vòng/phút, tỷ lệ nạp giống 1% (Huang *et al.*, 2019).

### Sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối bằng thiết kế Plackett – Burman

Thí nghiệm Plackett – Burman được thiết kế dựa trên kết quả khảo sát đơn yếu tố chọn ra được khoảng ảnh hưởng ứng với phạm vi khảo sát, bổ sung thêm yếu tố khoáng (MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> và NaCl). Hàm lượng các nguồn khoáng được lựa chọn dựa trên cơ sở các nghiên cứu (Gutiérrez *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2019; Mukhtar, 2018). Tổng 14 yếu tố được xem xét ở 3 mức độ: mức thấp (-1), mức cơ sở (0) và mức cao (+1) gồm 21 thí nghiệm được bố trí dựa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bằng phần mềm JMP 10 (Castillo, 2007).

### Tìm khoảng tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp leo dốc

Các thông số của phương pháp leo dốc được tính toán thông qua hệ số hồi quy từ phương trình hồi quy của thí nghiệm Plackett – Burman sau khi loại bỏ những yếu tố không ảnh hưởng đáng kể tới hàm mục tiêu (Nguyễn Văn Dự, Nguyễn Đăng Bình, 2011).

### Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD)

Sau khi tìm được khoảng giá trị tối ưu từ thí nghiệm leo dốc, các yếu tố có ý nghĩa được đưa vào mô hình tối ưu hóa (RSM-CCD). Mỗi yếu tố được xem xét ở 5 mức độ (-α, -1, 0, +1, +α), trong đó mức trung tâm (0) dựa theo kết quả của thí nghiệm leo dốc, gồm 20 thí nghiệm được bố trí dựa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bằng phần mềm JMP 10 (Nguyễn Văn Dự, Nguyễn Đăng Bình, 2011).

### Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Theo mô hình do phần mềm JMP 10 dự đoán giá trị tối ưu của từng yếu tố làm hàm đáp ứng đạt cực đại đã được xác định. Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm với thành phần và điều kiện môi trường tối ưu được thực hiện 11 lần lặp lại.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum*

Bảng 1. Kết quả khảo sát đơn yếu tố

Yếu tố	Ngưỡng tốt nhất	Mật độ log (CFU/mL)	Khoảng đưa vào Plackett – Burman
Thời gian (giờ)	24	9,031	16 - 32
Nhiệt độ (°C)	25	9,063	20 - 30
pH	8	9,079	5 - 11
Tốc độ lắc (vòng/phút)	180	8,922	120 - 240
Tỷ lệ nạp giống (%)	4,75	8,899	0,5 - 9
Mannitol (%)	0,5	9,002	0 - 1
Peptone (%)	0,15	8,85	0 - 0,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0,5	9,019	0 - 1

Kết quả về mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* thu được sau thí nghiệm đơn yếu tố cho thấy tất cả các yếu tố khảo sát đều có ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật. Do đó, các yếu tố này được đưa vào sàng lọc với mức nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

### Sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng chính đến quá trình tăng sinh khối bằng thiết kế Plackett – Burman

Bảng 2. Các biến trong ma trận Plackett – Burman và phân tích thống kê ANOVA

Ký hiệu	Yếu tố	Mức		Hệ số hồi quy	Giá trị	
		Thấp (-1)	Cao (+1)		t – Ratio	Prob >  t
	Hệ số tự do			6,812		
X1	Nhiệt độ (°C)	20	30	-0,162	-0,420	0,6919
X2	Tốc độ lắc (vòng/phút)	120	240	-0,121	-0,310	0,7658
X3	Thời gian nuôi	16	32	0,149	0,380	0,7143
X4	Tỷ lệ nạp giống (%)	0,5	9	1,071	2,750	<b>0,0333*</b>
X5	Mannitol (%)	0	1	0,407	1,050	0,3360

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

X6	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	0	1	-1,651	-4,240	<b>0,0054*</b>
X7	Peptone (%)	0	0,3	0,671	1,720	0,1357
X8	MgSO <sub>4</sub> (%)	0	0,03	0,689	1,770	0,1269
X9	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	0	0,25	-0,230	-0,590	0,5761
X10	FeCl <sub>3</sub> (%)	0	0,001	-0,451	-1,160	0,2902
X11	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (%)	0	0,0005	0,247	0,630	0,5493
X12	CaCO <sub>3</sub> (%)	0	0,5	-0,293	-0,750	0,4801
X13	NaCl (%)	0	0,5	-0,857	-2,200	0,0700
X14	pH	5	11	-1,861	-4,780	<b>0,0031*</b>
		R <sup>2</sup> = 0,9137		p-value = 0,0363		

Kết quả phân tích ở Bảng 2 cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,0363 < 0,05$ . Hệ số  $R^2 = 0,91$ , cho thấy số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán của mô hình.

Thí nghiệm này sàng lọc được 3 yếu tố ảnh hưởng chính là pH, nồng độ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tỷ lệ nạc giống. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với Huang và đồng tác giả (2019) khi tìm ra yếu tố có ảnh hưởng chính đến mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* là pH và tỷ lệ nạc giống. Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = 6,812 - 1,861X_1 - 1,651X_2 + 1,071X_3$$

Trong đó, Y là hàm mục tiêu (log (CFU/mL)), X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> lần lượt là các yếu tố pH, nồng độ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%) và tỷ lệ nạc giống (%).

#### Khoảng tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp leo dốc

Kết quả tính toán bước chuyển động của ba yếu tố ảnh hưởng chính theo phương pháp leo dốc được trình bày ở Bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả tính toán bước chuyển động của các yếu tố ảnh hưởng chính**

Thông số	pH – X <sub>1</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – X <sub>2</sub>	Tỷ lệ nạc giống (%) – X <sub>3</sub>
Mức thấp (-1)	5	0	0,5
Mức cơ sở (0)	8	0,5	4,75
Mức cao (+1)	11	1	9
Hệ số hồi quy b <sub>j</sub>	-1,861	-1,651	1,071
Khoảng biến thiên Δ <sub>j</sub>	3,000	0,500	4,250
Δ <sub>j</sub> b <sub>j</sub>	-5,583	-0,826	4,552
Bước chuyển động δ <sub>j</sub>	-0,676	-0,100	0,551

Chọn bước chuyển động của δ<sub>2</sub> = -0,100 và tính toán các bước chuyển động còn lại.

$$\delta_3 = \delta_2 \frac{b_3 \Delta_3}{b_2 \Delta_2} = -0,100 \frac{4,552}{-0,826} = 0,551$$

$$\delta_1 = \delta_2 \frac{b_1 \Delta_1}{b_2 \Delta_2} = -0,100 \frac{-5,583}{-0,826} = -0,676$$

**Bảng 4. Kết quả thí nghiệm leo dốc**

Thí nghiệm	Các yếu tố ảnh hưởng			Mật độ log (CFU/mL)
	pH	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Tỷ lệ nạc giống (%)	
0	8,00	0,5	4,750	9,074 ± 0,010 <sup>d</sup>
1	7,32	0,4	5,301	9,213 ± 0,058 <sup>c</sup>
2	6,65	0,3	5,853	9,318 ± 0,068 <sup>b</sup>
3	5,97	0,2	6,404	9,298 ± 0,012 <sup>b</sup>
<b>4</b>	<b>5,29</b>	<b>0,1</b>	<b>6,956</b>	<b>9,592 ± 0,061<sup>a</sup></b>
5	4,62	0,0	7,507	9,550 ± 0,006 <sup>a</sup>

Chú thích: a, b, c, d, ... là kết quả trắc nghiệm phân hạng được xét ở mức ý nghĩa ( $p < 0,05$ ), những giá trị trung bình của các thí nghiệm nào có ít nhất một ký tự giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa.

Kết quả Bảng 4 cho thấy nghiệm thức 4 cho giá trị mật độ cao nhất  $9,592 \pm 0,061$  log (CFU/mL) và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với 4 nghiệm thức còn lại. Riêng nghiệm thức 5 tuy sự khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức 4 nhưng lý do không chọn nghiệm thức 5 vì yếu tố  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ở nồng độ 0% là không phù hợp để tính mức alpha khi đưa vào thí nghiệm tối ưu. Vì vậy trong trường hợp này, khoảng giá trị của các yếu tố đưa vào thí nghiệm tối ưu là: pH (4,995 - 5,625), tỷ lệ nạc giống (6,680 - 7,232%),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,05 - 0,15%).

**Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD)**

**Bảng 5. Phân tích thống kê ANOVA của ma trận CCD**

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F-value	p-value	Ý nghĩa
Mô hình	9	0,288	0,032	19,169	<b>&lt;0,001*</b>	Ý nghĩa
Sự thiếu phù hợp (Lack of Fit)	5	0,010	0,002	1,494	<b>0,3349</b>	Không ý nghĩa
RSquare = 0,9452		RSquare Adj = 0,8959		RMSE = 0,0409		

\*Có ý nghĩa ở độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ .

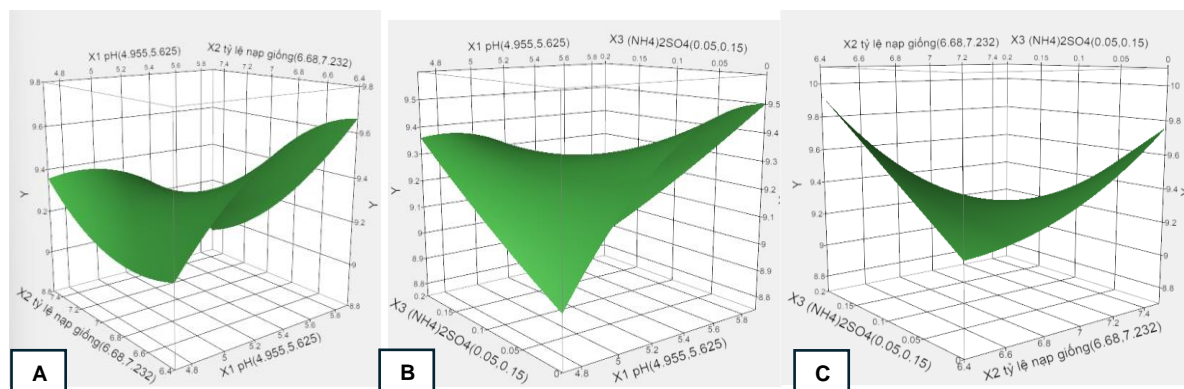
Kết quả phân tích phương sai của mô hình được trình bày trong Bảng 5, với p-value nhỏ ( $p\text{-value} < 0,0001$ ), điều này cho thấy độ tương thích tốt của phương trình hồi quy so với số liệu thực nghiệm, từ đó cho thấy độ tin cậy cao trong thống kê. Hệ số hồi quy ( $R^2$ ) là 0,9452 thể hiện rằng có 94,52% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán của mô hình. Theo Castillo (2007),  $R^2 > 0,75$  cho thấy rằng mô hình tương thích với thực tế. Kết quả kiểm định sự thiếu phù hợp của mô hình (Lack of Fit) có  $p = 0,335 > 0,05$  cho thấy rằng sự thiếu phù hợp không có ý nghĩa thống kê, từ đó kết luận mô hình phù hợp (Zabeti *et al.*, 2009).

Phương trình hồi quy đa thức bậc hai mô tả dự đoán mật độ vi khuẩn có dạng:

$$Y = 9,312 + 0,011X_1 - 0,025X_2 - 0,064X_3 - 0,074X_1X_2 - 0,067X_1X_3 - 0,103X_2X_3 - 0,051X_1^2 + 0,03X_3^2$$

Trong đó, Y là mật độ vi khuẩn (log (CFU/mL)), X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> lần lượt là các yếu tố pH, nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (%) và tỷ lệ nạc giống (%).

Từ bề mặt đáp ứng của mô hình rút ra được giá trị tối ưu cho điều kiện và thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* như sau: pH 5,3; tỷ lệ nạc giống 6,68%; nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,15% và đạt mật độ tối đa là 9,486 log (CFU/mL) (Hình 1).



**Hình 1. Bề mặt đáp ứng của mật độ vi khuẩn theo các cặp yếu tố ảnh hưởng**

A) pH và tỷ lệ nạc giống, B) pH và nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , C) Tỷ lệ nạc giống và nồng độ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Kiểm chứng thực tế mô hình tối ưu hóa**

**Bảng 6. Kết quả thực nghiệm kiểm tra độ chính xác của mô hình tối ưu hóa**

Nghiệm thức	Mật độ log (CFU/mL)
Môi trường ban đầu (TSB)	8,671
Môi trường tối ưu	9,477
Mô hình dự đoán	9,486

Kết quả kiểm chứng thực nghiệm của môi trường tối ưu là 9,477 log (CFU/mL) tương đương với kết quả dự đoán của mô hình là 9,486 log (CFU/mL). Từ đó cho thấy mô hình dự đoán rất đúng với thực nghiệm. Bên cạnh đó, mật độ vi khuẩn trong môi trường tối ưu cao hơn 6,67 lần so với môi trường TSB là 8,671 log (CFU/mL).

**KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

Từ các kết quả nghiên cứu trên xác định được thông số thành phần và điều kiện môi trường tối ưu cho chủng *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 là mannitol 0,5%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,15%; peptone 0,15%;  $\text{MgSO}_4$  0,015%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,125%; NaCl 0,25%;  $\text{FeCl}_3$  0,0005%;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,00025%;  $\text{CaCO}_3$  0,25%; tốc độ lắc 180 vòng/phút; pH 5,3; nhiệt độ 30°C và tỷ lệ nạp giống 6,68% đạt mật độ tối đa là 9,477 log (CFU/mL) sau 24 giờ nuôi cấy, cao hơn 6,67 lần so với môi trường ban đầu TSB là 8,671 log (CFU/mL).

Tiếp tục đánh giá khả năng cố định đạm của chủng *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 nuôi cấy trong môi trường trước và sau khi tối ưu. Từ đó hướng đến ứng dụng sản xuất phân bón sinh học.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện tại phòng Công nghệ Vi sinh thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Tôi xin cảm ơn đến Trung tâm Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi, cảm ơn nhóm nghiên cứu đã hỗ trợ cùng tôi thực hiện nghiên cứu này.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Bhardwaj D, Ansari M, Sahoo R, Tuteja N (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13: 66.
- Castillo ED (2007). Process Optimization, International Series in Operations Research & Management Science. Springer US, Boston, MA.
- Gosal SK, Kalia A, Uppal SK, Kumar R, Walia SS, Singh K, Singh H (2012). Assessing the Benefits of Azotobacter Bacterization in Sugarcane: A Field Appraisal. *Sugar Tech*, 14: 61–67.
- Gutiérrez I, Torres Geraldo A, Moreno N (2011). Optimising carbon and nitrogen sources for Azotobacter chroococcum growth. *African Journal of Biotechnology*, 10: 2951–2958.
- Huang JF, Zhang DF, Leng B, Lin ZC, Pan YT (2019). Response surface optimization of conditions for culturing Azotobacter chroococcum in Agaricus bisporus industrial wastewater. *J Gen Appl Microbiol*, 65: 163–172.
- Mukhtar H (2018). Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer. *JBMOA* 6.
- Nguyễn Văn Dự, Nguyễn Đăng Bình (2011). Quy hoạch thực nghiệm trong kỹ thuật. *Khoa học và Kỹ thuật*.
- Zabeti M, Daud WMAW, Aroua MK (2009). Optimization of the activity of  $\text{CaO}/\text{Al}_2\text{O}_3$  catalyst for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Catalysis A: General*, 366: 154–159.

## OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM FOR *Azotobacter chroococcum* BACTERIA WITH NITROGEN FIXATION CAPABILITY

Pham Thi Duy Anh<sup>1\*</sup>, Hoa Truong Minh Hieu<sup>1</sup>, Tran Chi Hieu<sup>2</sup>, Phan My Hanh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology - Biotechnology – University of Science University of Ho Chi Minh city

<sup>2</sup>Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

**SUMMARY**

*Azotobacter chroococcum* not only takes a key role in nitrogen fixation but also plays an important role in sustainable agriculture because of its particularity that is plant growth promoting rhizobacteria as well as the production of biological control agents against plant pathogens. In this research, the process of cultivating *Azotobacter chroococcum* biomass was optimized using the experimental planning method. We conducted a single-factor survey to determine the range of influence for each factor. Screening using the Plackett-Burman method was conducted and 3 factors with the strongest impact were selected: pH,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration and inoculum size ( $p < 0,05$ ). Finding the optimal range of the 3 main influencing factors using the method of steepest ascent and optimizing the culture medium using the response surface method (RSM) according to the central composite design (CCD). The parameters of component and condition medium were determined: mannitol 0.5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.15%, peptone 0.15%,  $\text{MgSO}_4$  0.015%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.125%, NaCl 0.25%,  $\text{FeCl}_3$  0.0005%,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.00025%,  $\text{CaCO}_3$  0.25% and with conditions such as rotation speed of 180 rpm, pH 5.3, temperature of 30°C, inoculum size 6.68% (v/v) reaching a maximum density of 9.477 log (CFU/mL) after 24 hours of culture, higher by about 6.67 fold than the initial TSB culture medium is 8.671 log (CFU/mL).

**Keywords:** *Azotobacter chroococcum*, nitrogen fixation, Plackett-Burman, Method of Steepest Ascent, RSM-CCD.

\* Author for correspondence: Tel: +84-979952601; Email: anhduypham5112002@gmail.com