

## TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CHŨNG VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITROGEN VÀ THỬ NGHIỆM BỔ SUNG SINH KHỐI VÀO ĐẤT TRỒNG CÂY NGẬP MẶN

PHẠM THỊ NGỌC LAN, NGUYỄN THỊ VIỆT  
Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Hiện nay, công tác ươm trồng và phục hồi rừng ngập mặn (RNM) đang được quan tâm và triển khai theo hướng phát triển bền vững ở nhiều vùng cửa sông, đầm phá ven biển. Tuy nhiên, hiệu quả đạt được vẫn chưa cao. Nguyên nhân chủ yếu là do việc ươm trồng tự phát, việc chọn giống, kỹ thuật gieo ươm, trồng và chăm sóc cây ngập mặn chưa được đầu tư đúng mức. Bên cạnh đó, với nền đất nghèo dinh dưỡng cùng với sâu bệnh hại, thời tiết không thuận lợi cũng là những khó khăn trở ngại. Để hỗ trợ cho công tác ươm trồng, tạo sức sống tốt cho cây con chúng tôi đặt vấn đề nghiên cứu khu hệ vi sinh vật có lợi trong đất ngập mặn, trong đó có vi khuẩn cố định nitrogen (N) để có thể sử dụng như một tác nhân thúc đẩy sự sinh trưởng phát triển của thảm thực vật qua đó sẽ tăng cường hiệu quả ươm trồng cây ngập mặn. Trong khuôn khổ bài báo chúng tôi đề cập đến các thử nghiệm nhằm tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy các chủng vi khuẩn cố định N để tạo chế phẩm sinh học và đưa trở lại đất ươm trồng cây ngập mặn.

### I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Đối tượng nghiên cứu

- Hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas pseudoalcaligenes* V94 và *Klebsiella pneumonia* V204 có khả năng cố định N được phân lập từ đất vùng rễ cây ngập mặn ở Thừa Thiên-Huế. Chúng được lưu giữ tại bộ môn Sinh học Ứng dụng, khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Huế.

- Đối tượng thử nghiệm: cây Trang (*Kandelia candel*), hạt cây Bần trắng (*Sonneratia alba*) được trồng ở vườn ươm khoa Sinh, trường Đại học Khoa học Huế.

#### 2. Phương pháp nghiên cứu

##### - Xác định hàm lượng $N-NH_4^+$ và sự tích lũy sinh khối của các chủng vi khuẩn

Nuôi cấy hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 trong môi trường Ashby dịch thể với các điều kiện thời gian, nồng độ muối NaCl, pH môi trường, nguồn carbon và các nguồn nitrogen khác nhau. Sau khi nuôi cấy, ly tâm tách riêng phần dịch lọc và sinh khối. Xác định hàm lượng  $N-NH_4^+$  bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [2], và xác định sinh khối theo phương pháp cân.

##### - Đánh giá ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn đến khả năng nảy mầm của hạt và khả năng sinh trưởng phát triển của cây

Để thăm dò ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn cố định N đến khả năng nảy mầm của hạt: tiến hành nuôi vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể ở điều kiện thích hợp, thu sinh khối tươi để xử lý hạt. Công thức thí nghiệm (TN): hạt bần (50 hạt) được ngâm xử lý với nước ấm trong thời gian 4 giờ. Sau đó, chuyển hạt qua ngâm trong dịch sinh khối vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 (150 mL/50 hạt) trong thời gian 4 giờ. Sau đó, hạt được rải đều trên đĩa petri có lót bông ẩm, ủ ở nhiệt độ  $35^{\circ}C$ , theo dõi thời gian nảy mầm và đếm số hạt nảy mầm. Đo chiều dài thân mầm và rễ mầm sau các khoảng thời gian 3, 7, 15 ngày. Công thức đối chứng (ĐC): hạt bần bố trí nảy mầm như công thức thí nghiệm, nhưng chỉ ngâm trong nước ấm, trong thời gian 8 giờ.

- **Thử nghiệm ảnh hưởng của hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 đến sinh trưởng phát triển (STPT) của cây:** TN được tiến hành tại vườn thí nghiệm Trường Đại học Khoa học Huế. Cây Trang (*Kandelia candel*) được trồng trong các bầu đất ngập mặn. Kích thước bầu 10 x 20 cm. Lượng vi khuẩn được bón là 50 mL dịch nuôi cấy/bầu đất ( $2 \times 10^7$  tế bào/mL) và bón nhắc lại sau 30 ngày. Đồng thời với các công thức TN có bón sinh khối vi khuẩn, công thức không bón sinh khối vi khuẩn cũng được thiết lập để làm ĐC, các công thức TN được bố trí sát nhau theo hàng ngang, mỗi công thức có 35 cây. Tiến hành đo chiều cao cây và đếm số lá sau 90 ngày bón sinh khối vi khuẩn. Chiều cao cây (cm) được xác định bằng phương pháp đo từ gốc đến ngọn, số lá/cây được xác định bằng phương pháp đếm.

- **Xử lý số liệu**

Thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncans' test  $p < 0,05$ ) bằng chương trình SPSS 16.0.

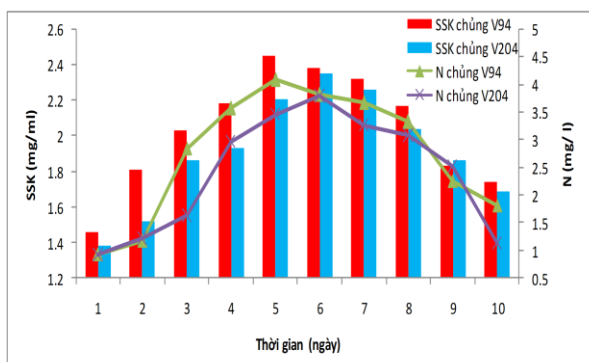
**II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến hàm lượng  $N-NH_4^+$  và sự tích lũy sinh khối của chủng V94 và V204**

**1.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy**

Hai chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 được nuôi cấy trong môi trường Ashby dịch thể tương ứng với các khoảng thời gian là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ngày. Sau đó xác định hàm lượng  $N-NH_4^+$  và sinh khối khô.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Kim Anh và cs (2008), thời gian nuôi cấy tối ưu cho sinh trưởng và khả năng cố định N của chủng vi khuẩn BK-6 thuộc chi *Azotobacter* phân lập từ đất tại Phường Hòa Quý, quận Ngũ Hành Sơn, thành phố Đà Nẵng là 5 ngày [1]. Bên cạnh đó, Đỗ Kim Nhung và cộng sự (2011) khi nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới khả năng cố định N của 12 dòng vi khuẩn *Azospirillum* sp. cho kết quả thời gian nuôi cấy tối ưu chỉ sau 4 ngày [5].



**Hình 1: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến STPT và hàm lượng  $N-NH_4^+$  của hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204**

**Ghi chú:** SSK: sinh khối khô; N: hàm lượng  $N-NH_4^+$

Hàm lượng  $N-NH_4^+$  của chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 cao hơn so với chủng *K. pneumonia* V204.

**1.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl**

Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể bổ sung NaCl ở các nồng độ 0,2%, 6%, 12%, 18%, 24%, 30%. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ muối (NaCl) có ảnh hưởng khá rõ rệt đến sự tích lũy sinh khối và cố định  $N-NH_4^+$  của 2 chủng vi khuẩn. Đối với chủng *P.*

*Pseudoalcaligenes* V94, nồng độ NaCl thích hợp nhất cho sinh trưởng phát triển là 12%. Đối với chủng *K. pneumonia* V204, nồng độ NaCl thích hợp nhất cho sinh trưởng phát triển là 6%.

Theo kết quả nghiên cứu của Usha và cs (2011), 5 chủng vi khuẩn *Azospirillum* spp. Có khả năng cố định N phân lập từ đất vùng rễ cây lúa (Tamil Nadu, Ấn Độ) có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh nhất trong môi trường có nồng độ muối 8‰ [7].

Kết quả cho thấy, 2 chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 thích nghi với khoảng nồng độ muối NaCl khá rộng, khoảng 0,2-12‰. Đây là ưu điểm nổi trội của chủng giống khi sử dụng làm chế phẩm đạm sinh học dùng cho đất ngập mặn.

### 1.3. Ảnh hưởng của pH môi trường

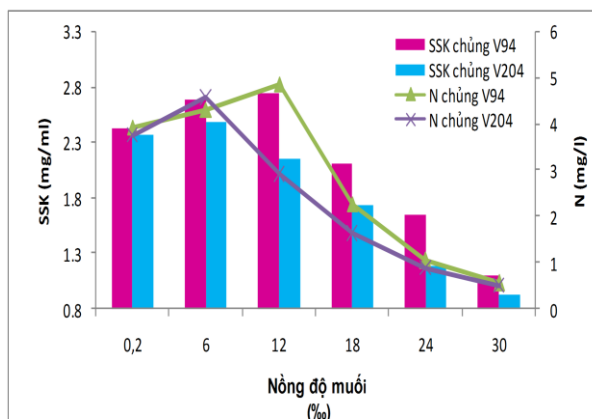
Chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 được nuôi cấy trong môi trường Ashby dịch thể tương ứng với các mức pH 4; 5; 6; 7; 8; 9. Kết quả phân tích hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> và sinh khối khô cho thấy, pH tối ưu cho sinh trưởng và cố định N của chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 là 6 (sinh khối khô đạt 2,615-2,857 mg/mL và hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> đạt 5,067-5,483 mg/L). Cả 2 chủng nghiên cứu đều có khả năng sinh trưởng phát triển trong phạm vi pH khá rộng (4-8), đặc biệt là pH 5-7, khoảng pH này cũng phù hợp với pH của môi trường đất ngập mặn.

Sự phù hợp giữa pH môi trường nuôi cấy và pH đất là điều kiện thuận lợi để sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định N bón trở lại đất. Điều này sẽ khắc phục được nhược điểm của một số loại phân sinh học do không phù hợp với pH đất nên không phát huy tốt hiệu quả của phân bón.

Theo nghiên cứu của Đỗ Hoàng Quân (2011) về ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính cố định N của chủng vi khuẩn Az 03 và Az 07 thuộc chi *Azotobacter* phân lập từ đất canh tác thì giá trị pH thích hợp cho sinh trưởng, phát triển và cố định N của các chủng nghiên cứu từ 7,0 - 7,5 [6].

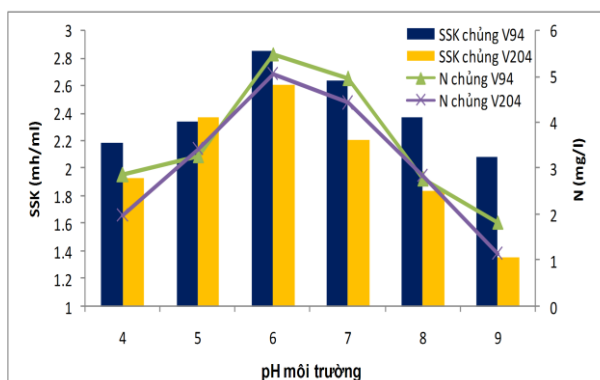
### 1.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể sử dụng các nguồn carbon là glucose, fructose, saccharose, ri đường, tinh bột, CMC, maltose, mannitol, lactose ở điều kiện pH môi trường là 6, nồng độ muối (6-12‰) và thời gian nuôi cấy 5-6 ngày.



Hình 2: Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến STPT và hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204.

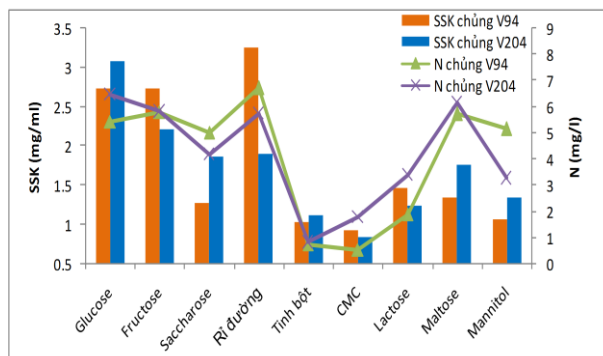
Ghi chú: SSK: sinh khối khô; N: hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>



Hình 3: Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy đến STPT và hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204.

Ghi chú: SSK: sinh khối khô; N: hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Đối với chủng *P. pseudoalcaligenes* V94, nguồn carbon thích hợp nhất cho STPT là rỉ đường, sau đó giảm dần từ fructose, maltose, glucose, mannitol, saccharose, lactose. Nguồn tinh bột và CMC không thích hợp cho sự tích lũy sinh khối của chủng *P. pseudoalcaligenes* V94. Đối với chủng *K. pneumonia* V204, nguồn carbon thích hợp nhất cho STPT là glucose, sau đó giảm dần từ maltose, fructose, rỉ đường, saccharose, lactose, mannitol. Nguồn tinh bột và CMC cũng không thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng *K. pneumonia* V204.



Hình 4: Ảnh hưởng của nguồn carbon đến STPT và hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204  
Ghi chú: SSK: sinh khối khô; N: hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

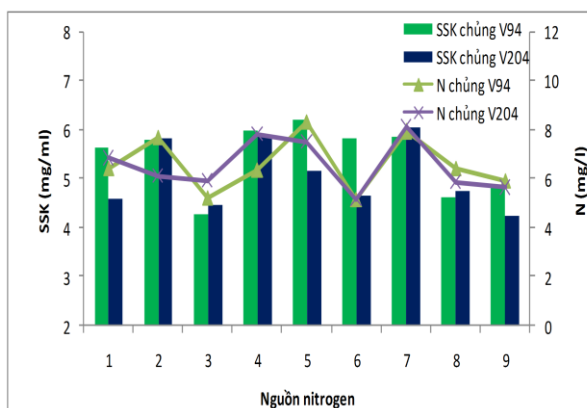
Qua kết quả trên cho thấy, hai chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 thích hợp với nguồn carbon là rỉ đường và glucose. Đây là nguồn carbon rẻ tiền vì vậy nó có ý nghĩa lớn về mặt kinh tế trong việc nghiên cứu, nhân nuôi đối với quy mô sản xuất lớn.

Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Hương Xuân (2005), hai nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển của hai chủng vi khuẩn cố định N N130 và N145 là glucose và saccharose [4].

### 1.5. Ảnh hưởng nguồn nitrogen

Thử nghiệm nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể có bổ sung các nguồn N là gelatine, peptone, urea, cao thịt, NH<sub>4</sub>Cl, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các nguồn N có ảnh hưởng khác nhau đến STPT của vi khuẩn.

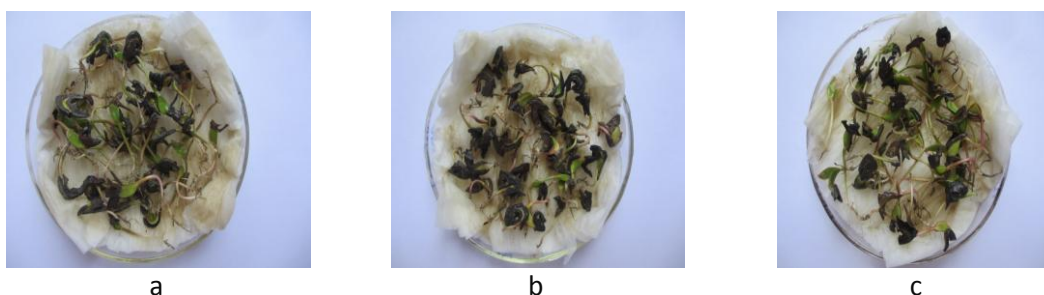
Chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 sinh trưởng phát triển tốt nhất trong môi trường có bổ sung NH<sub>4</sub>Cl và cho sinh khối thấp nhất là môi trường có urea. Chủng vi khuẩn *K. pneumonia* V204 sinh trưởng phát triển tốt nhất trong môi trường có NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> và cho sinh khối thấp nhất cũng là môi trường có NaNO<sub>3</sub>. Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Hương Xuân (2005), nguồn N thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng phát triển của chủng vi khuẩn N130 và N145 phân lập từ đất canh tác là NH<sub>4</sub>Cl [4].



Hình 5: Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến STPT và hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của chủng hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204  
Ghi chú: SSK: sinh khối khô; N: hàm lượng N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 1. Gelatine; 2. Peptone; 3. Urea; 4. Cao thịt; 5. NH<sub>4</sub>Cl; 6. KNO<sub>3</sub>; 7. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 8. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 9. NaNO<sub>3</sub>

## 2. Thăm dò ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn cố định N

Kết quả thăm dò ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn cố định N đến sự nảy mầm của hạt cây Bần trắng được trình bày ở bảng 1.



Hình 6: Ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 đến chiều dài của rễ, thân mầm của hạt cây Bann trắng (a. V94; b. Đối chứng; c. V204) (ảnh: Nguyễn Thị Việt)

Bảng 1

Ảnh hưởng của sinh khối chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 đến tỉ lệ nảy mầm, chiều dài thân và rễ mầm của hạt cây Bann trắng

Công thức TN		<i>P. pseudoalcaligenes</i> V94	<i>K. pneumonia</i> V204	ĐC
Chỉ tiêu	Tỉ lệ	94,67 <sup>a</sup>	94,33 <sup>a</sup>	53 <sup>b</sup>
	Tỉ lệ nảy mầm (%)	178,62	177,98	100,00
Chiều dài thân và rễ mầm (mm)	3 ngày	0,73 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,40 <sup>b</sup>
	% so ĐC	182,50	167,50	100,00
	7 ngày	15,16 <sup>a</sup>	14,97 <sup>a</sup>	8,36 <sup>b</sup>
	% so ĐC	181,28	179,65	100,00
	15 ngày	26,23 <sup>a</sup>	26,00 <sup>a</sup>	13,74 <sup>b</sup>
% so ĐC	205,76	205,02	100,00	

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (Duncan's test)

Sau 3 ngày ủ, các hạt bann ở công thức thí nghiệm bắt đầu nảy mầm chiếm hơn 70%, rễ phát triển vào bông ẩm, ở công thức đối chứng số lượng hạt mới bắt đầu nảy mầm rất thấp chỉ 15%. Tiếp tục ủ, sau 15 ngày, hạt bann ở công thức thí nghiệm nảy mầm với tỉ lệ hơn 94% với chiều dài rễ và thân mầm từ 26-26,3 mm, còn ở công thức đối chứng tỉ lệ nảy mầm là 53% với chiều dài rễ và thân mầm chỉ đạt 13,74 mm.

Sau 90 ngày bón sinh khối vi khuẩn tiến hành đánh giá ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn qua một số chỉ tiêu sinh lý của cây Trang. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

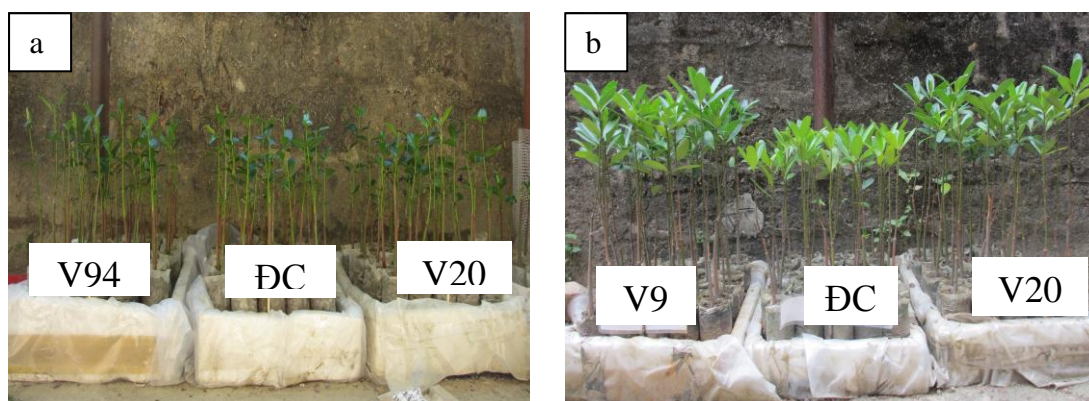
Như vậy, việc xử lý cây Trang (*Kandelia candel*) bằng sinh khối vi khuẩn có ảnh hưởng khá rõ đến khả năng STPT của cây. Ở công thức thí nghiệm, chiều cao cây và số lá đều tăng so với đối chứng. Nguyên nhân của sự tăng số lá và chiều cao cây ở các công thức thí nghiệm là do khi bón sinh khối vi khuẩn vào đất, hoạt động trao đổi chất của chúng sẽ chuyển hóa N giúp cho cây hấp thụ dễ dàng hơn là cơ sở để cây tăng trưởng. Bên cạnh đó, có thể sự sinh tổng hợp auxin của vi khuẩn cố định N là tác nhân ảnh hưởng đến sự STPT của cây. Đối với chủng *P. pseudoalcaligenes* V94, xử lý với sinh khối vi khuẩn thì chiều cao trung bình của cây ở công thức thí nghiệm sau 90 ngày tăng 32,09% và số lá tăng 25,52% so với cây đối chứng. Đối với chủng *K. pneumonia* V204, chiều cao trung bình của cây ở công thức thí nghiệm sau 90 ngày xử lý với sinh khối vi khuẩn tăng 29,42% và số lá tăng 21,06% so với cây đối chứng.

Bảng 2

**Ảnh hưởng của sinh khối chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 đến chiều cao và số lá của cây Trang**

Công thức TN	Chiều cao cây (cm)			Số lá/cây		
	Trước TN	Sau TN	% so ĐC	Trước TN	Sau TN	% so ĐC
V94	19,47 <sup>a</sup>	46,68 <sup>a</sup>	132,09	5,25 <sup>a</sup>	9,16 <sup>a</sup>	125,52
ĐC	19,53 <sup>a</sup>	35,45 <sup>b</sup>	100,00	5,28 <sup>a</sup>	7,36 <sup>b</sup>	100,00
V204	19,48 <sup>a</sup>	45,76 <sup>a</sup>	129,42	5,20 <sup>a</sup>	8,75 <sup>a</sup>	121,06

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (Duncan's test)



**Hình 7: Ảnh hưởng của sinh khối vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 đến STPT của cây Trang**

(a. Cây ban đầu; b. Cây sau 90 ngày bón sinh khối vi khuẩn) (ảnh: Nguyễn Thị Việt)

Nhìn chung xét về cả 2 chỉ tiêu chiều cao và số lá thì chủng *P. pseudoalcaligenes* V94 phát huy hiệu quả tốt hơn *K. pneumonia* V204. Bên cạnh đó, theo dõi khả năng chống chịu sâu bệnh của cây thì thấy cây có bón chế phẩm vi khuẩn có khả năng chống chịu cao, thân cây to và chắc khỏe hơn so với đối chứng.

### III. KẾT LUẬN

1. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh trưởng phát triển của hai chủng vi khuẩn *P. pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 trong môi trường Ashby dịch thể:

- Chủng *P. Pseudoalcaligenes* V94: thời gian nuôi cấy 5 ngày; nồng độ NaCl 12‰; pH môi trường 6,0; nguồn carbon là rỉ đường và nguồn nitrogen là  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

- Chủng *K. pneumonia* V204: thời gian nuôi cấy 6 ngày; nồng độ NaCl 6‰; pH môi trường 6,0; nguồn carbon là glucose và nguồn nitrogen là  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

2. Xử lý chế phẩm vi khuẩn với hạt bần cho tỷ lệ nảy mầm đạt 94,33-94,67% (đối chứng chỉ đạt 53%), chiều dài rễ và thân mầm đạt 26-26,23 mm, cao gấp 1,8-1,9 lần so với đối chứng. Lấy nhiễm sinh khối 2 chủng *P. Pseudoalcaligenes* V94 và *K. pneumonia* V204 vào đất trồng cây Trang sau 90 ngày: chiều cao cây tăng 29,42-32,09%, số lá/cây tăng 21,06-25,52% so với đối chứng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Kim Anh, Phạm Thị Ngọc Anh, Lê Thị Thúy Hoa, Nguyễn Thị Quỳnh Như, Đậu Thị Tĩnh**, 2008. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Azotobacter* có hoạt tính nitrogenaza và sinh tổng hợp IAA (indol axetic axit) từ đất thôn Bình Kỳ- Hòa Quý- Ngũ Hành Sơn- Tp. Đà Nẵng. Tuyển tập báo cáo “hội nghị sinh viên nghiên cứu khoa học” lần thứ 6. Đại học Đà Nẵng.
2. **Đoàn Văn Cung, Phạm Văn Quyển, Trần Thúc Sơn, Nguyễn Văn Sức, Trần Thị Tâm**, 1998. Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón cây trồng, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. **Phạm Thị Ngọc Lan**, 2012. Thực tập Vi sinh vật học, Nxb. Đại học Huế.
4. **Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Hương Xuân**, 2005. Tìm hiểu vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong đất canh tác bạc màu ở Thừa Thiên-Huế. Báo cáo khoa học hội thảo toàn quốc Đa dạng Sinh học Việt Nam. Hà Nội, trang 120-125.
5. **Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công**, 2011. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, 18a: 161-167.
6. **Đỗ Hoàn Quân**, 2011. Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các đặc tính tăng trưởng, cố định đạm của vi khuẩn *Azotobacter* - thử nghiệm trên cây trồng. Luận văn Thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
7. **Usha DK., Kanimozhi K.**, 2011. *Advances in Applied Science Reseach* 2 (3): 239- 245.

## OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR NITROGEN FIXING BACTERIA AND AMENDMENT OF THEIR BIOMASS TO MANGROVE SOIL

PHAM THI NGOC LAN, NGUYEN THI VIET

### SUMMARY

The culture conditions were optimized for biomass production and nitrogen fixing activity of two bacteria strains *Pseudomonas pseudoalcaligenes* V94 and *Klebsiella pneumonia* V204. As a result, their biomass were optimal (6.05-6.21 mg/mL) in Ashby liquid medium supplied with molasse or glucose,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  at pH=6, salinity 6-12‰ after 5-6 days. In this condition, the contents of N- $\text{NH}_4^+$  were 8.14-8.34 mg/L. Biomass of two nitrogen fixing bacteria strains *P. pseudoalcaligenes* V94 and *K. pneumonia* V204 were also tested for germination of *Sonneratia mossambicensis* seeds and amendment to mangrove soil in which *Kandelia candel* trees were planted. The germination of seeds increased to 94% and length of the stem and sprouting root were doubled compared with the control sample. Some other characteristics of *Kandelia candel* have been improved, after 90 days, the height and number of leaves increased 29.42-32.09 % and 21.06-25.52%, respectively.