

**STUDY TO EVALUATE THE EFFECTIVENESS OF FREEZE-DRYING PRESERVATION OF STRAINS *STREPTOMYCES PARVULLUS* HT19.1 AND *STREPTOMYCES SP.* HT17.8 CONTAINING THE ANTIBIOTIC ABILITY AGAINST PATHOGENIC FUNGI IN PLANTS BY DEEP FREEZING PRETREATMENT TECHNIQUE AND USE OF PROTECTANTS**

Do Thi Tuyen<sup>1</sup>, Dinh Thi Lan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Sub - Institute of Biotechnology - Vietnam-Russia Tropical Centre, <sup>2</sup>TNU - University of Science

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 15/11/2022	To improve the efficiency of freeze-drying preservation of strains <i>Streptomyces parvullus</i> HT19.1 and <i>Streptomyces sp.</i> HT17.8, this study focused on evaluating the survival rate in freeze-drying using deep freezing pretreatment technique and protectants of two strains. The results showed that the survival rate of both strains in the sample pretreatment formula at -80°C was higher than at -20°C and higher than the control without deep freezing pretreatment, the survival rate reached 65% with HT19.1 strain and 69% with HT17.8 strain. When the two microorganism strains were deep freezing pretreatment combined with the use of protectants including lactose, sucrose, trehalose, and skim milk, their survival rates were 59 - 83%, which is significantly greater than the control (23 - 26%). Using a combination of protectants including trehalose 10%, skim milk 10%, sodium glutamate 1% and NaCl 0.9% and deep freezing pretreatment at -80°C provided the best protective effect, the survival rates were 92 - 95% and the density of microorganisms after freeze-drying reached $\geq 10^{10}$ CFU/mL. The quality of freeze-dried microbial strains after 12 months of preservation at room temperature.
Revised: 05/4/2023	
Published: 13/4/2023	
<b>KEYWORDS</b>	
Freeze-drying preservation	
Protectants	
Antibiotic	
Survivability	
Deep freezing pretreatment technique	
Microorganisms	

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ BẢO QUẢN ĐÔNG KHÔ CHỦNG XẠ KHUẨN *STREPTOMYCES PARVULLUS* HT19.1 VÀ *STREPTOMYCES SP.* HT17.8 CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT BẰNG KỸ THUẬT TIỀN XỬ LÝ LẠNH SÂU VÀ SỬ DỤNG CHẤT BẢO VỆ**

Đỗ Thị Tuyền<sup>1</sup>, Đinh Thị Lan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Phân viện Công nghệ Sinh học - Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, <sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 15/11/2022	Nhằm nâng cao hiệu quả bảo quản đông khô chủng giống xạ khuẩn, nghiên cứu tập trung đánh giá tỷ lệ sống sót của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces parvullus</i> HT19.1 và chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces sp.</i> HT17.8 trong bảo quản đông khô sử dụng kỹ thuật tiền xử lý lạnh sâu và các chất bảo vệ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ sống sót của 2 chủng HT19.1 và HT17.8 trong công thức tiền xử lý mẫu ở nhiệt độ -80°C, cao hơn ở -20°C và cao hơn đối chứng không xử lý lạnh sâu, tỷ lệ sống sót đạt 65% với chủng HT19.1 và 69% với chủng HT17.8. Tỷ lệ sống sót của 2 chủng nghiên cứu đạt 59 - 83% khi mẫu vi sinh vật được xử lý lạnh sâu trước đông khô kết hợp với sử dụng các chất bảo vệ, gồm lactose, sucrose, trehalose, skim milk cao hơn có ý nghĩa so với 23 - 26% ở công thức đối chứng. Sử dụng phối hợp các chất bảo vệ gồm: trehalose 10%, skim milk 10%, natri glutamat 1% và NaCl 0,9% kết hợp tiền xử lý lạnh sâu ở -80°C cho hiệu quả bảo quản tốt nhất, tỷ lệ sống sót đạt 92 - 95%, trong đó mật độ vi sinh vật sau đông khô đạt $\geq 10^{10}$ CFU/mL. Chất lượng mẫu vi sinh vật đông khô đảm bảo chất lượng sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng.
Ngày hoàn thiện: 05/4/2023	
Ngày đăng: 13/4/2023	
<b>TỪ KHÓA</b>	
Bảo quản đông khô	
Chất bảo vệ	
Hoạt tính kháng sinh	
Khả năng sống sót	
Kỹ thuật tiền xử lý lạnh sâu	
Vi sinh vật	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6936>

\* Corresponding author. Email: landt@mus.edu.vn

## 1. Giới thiệu

Bảo quản chủng giống vi sinh vật với mục tiêu duy trì khả năng sống sót và đảm bảo tính ổn định di truyền, các hoạt tính sinh học của chủng giống trong thời gian dài. Điều này được thực hiện thông thường bằng phương pháp bảo quản lạnh sâu (ở  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  hay  $-196^{\circ}\text{C}$ ) sử dụng các trang thiết bị chuyên dụng như tủ bảo quản đông lạnh, bình chứa nitơ lỏng để duy trì liên tục trạng thái bảo quản. Tuy nhiên trong thực tế, việc không đảm bảo duy trì nguồn điện liên tục hay không kịp thời bổ sung nitơ lỏng có thể làm ảnh hưởng tới khả năng hồi phục của chủng giống, gây mất mẫu, cũng như tổn thất về thời gian và kinh tế. Việc duy trì các thư viện mẫu lớn sử dụng phương pháp bảo quản lạnh sâu gây chiếm không gian lớn với hệ thống tủ đông lạnh, các chi phí duy trì bảo quản cũng như công tác vận chuyển mẫu gặp nhiều khó khăn [1]. Nhằm khắc phục những hạn chế trên, phương pháp bảo quản đông khô đã được sử dụng linh hoạt, thích hợp bảo quản vi sinh vật và bảo quản các vật liệu sinh học nhạy cảm với nhiệt độ như protein và vắc xin ở điều kiện nhiệt độ môi trường trong thời gian dài [1], [2]. Đây cũng là phương pháp phổ biến được sử dụng tại các bảo tàng vi sinh vật trên thế giới và một số đơn vị nghiên cứu ở Việt Nam đã được trang bị thiết bị đông khô chuyên dụng.

Quá trình đông khô dựa trên phương thức loại bỏ nước từ các mẫu đã được làm lạnh sâu ở điều kiện chân không, theo đó đình chỉ nhanh chóng các quá trình trao đổi chất của vi sinh vật và chuyển hoá tế bào thành dạng bột khô giúp thuận lợi trong quá trình bảo quản dài hạn ở điều kiện nhiệt độ môi trường [2], [3]. Trên thực tế, quá trình đông khô được biết là gây bất lợi cho vi sinh, làm tổn hại nghiêm trọng đến màng tế bào và protein, gây giảm khả năng tồn tại của tế bào, tỷ lệ sống sót thấp tới 0,1% sau đông khô chủng giống đã được báo cáo [4]. Để khắc phục khó khăn trên, trước quá trình đông khô, huyền phù vi khuẩn cần được tiền xử lý lạnh sâu trước khi chuyển sang bước làm khô sơ cấp và thứ cấp trong điều kiện chân không. Kỹ thuật tiền xử lý lạnh sâu thường được sử dụng ở các điều kiện nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  hay nhúng trong nitơ lỏng  $-196^{\circ}\text{C}$  [5], [6]. Đồng thời, việc bổ sung các chất bảo vệ thuộc nhóm disaccharides (như trehalose, sucrose, lactose) và protein (skim milk) trước khi tiền xử lý lạnh sâu giúp ngăn ngừa tổn thương cho các tế bào do sự hình thành tinh thể băng trước khi đưa vào bảo quản [7], [8]. Một số nghiên cứu cũng chỉ ra việc kết hợp giữa skim milk tỷ lệ 10% (w/v) với một số thành phần khác như natri glutamate, trehalose, raffinose hay mật ong giúp tăng khả năng sống sót của tế bào *Saccharomyces cerevisiae* từ 30% lên 96 - 98% [3]. Hầu hết các mẫu bảo quản đông khô có thể được lưu trữ trong ít nhất một năm mà không đòi hỏi duy trì trạng thái bảo quản đặc biệt, với một số nguồn vi khuẩn có thể tồn tại trong vài thập kỷ khi được bảo quản đúng cách [9]. Các mẫu cấy đông khô có thể được phục hồi đơn giản bằng cách bù nước hoặc dung dịch muối đệm phosphate (PBS) trước khi cấy chuyển vào môi trường dinh dưỡng mới [2], [5]. Phương pháp bảo quản này có hiệu quả với những chủng vi sinh vật có nhiều đặc tính quý thuộc các nhóm vi sinh vật khác nhau như nấm sợi, nấm men, vi khuẩn, xạ khuẩn [2], [10], [11].

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng kỹ thuật tiền xử lý lạnh sâu và các chất bảo vệ tới hiệu quả của quá trình bảo quản đông khô chủng xạ khuẩn *Streptomyces parvullus* HT19.1 và chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. HT17.8, có nguồn gốc phân lập từ đất trồng chè thuộc khu vực Thái Nguyên. Hai chủng xạ khuẩn này đã được nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và phân loại, hoạt tính kháng một số nấm gây bệnh thực vật (*F.oxysporum*, *F.solani*, *A.niger*) cũng đã được ghi nhận [12], [13].

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng xạ khuẩn *Streptomyces parvullus* HT19.1 và chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. HT17.8 có hoạt tính kháng một số nấm gây bệnh thực vật được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên.

- Chủng vi sinh vật kiểm định: *Fusarium oxysporum* VTCCF-1301, *Aspergillus niger* VTCCF-001, *Fusarium solani* VTCCF-1302 do Viện Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật cung cấp. Môi trường Gause 1 nuôi cấy xạ khuẩn, môi trường Czapek nuôi cấy nấm mốc.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng tiền xử lý lạnh sâu đến tỷ lệ sống sót của vi sinh vật sau đông khô

Nuôi cấy chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 trên môi trường Gause 1 dịch thể ở điều kiện 28 - 30°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 48 giờ. Ly tâm 1000  $\mu$ L dịch nuôi cấy ở tốc độ 10000 vòng/phút để loại bỏ dịch và thu sinh khối tế bào, bổ sung 200  $\mu$ L dung dịch chất bảo vệ skim milk 10% vào các ống lưu trữ lạnh tế bào Cryotube chứa sinh khối trước khi tiến hành tiền xử lý lạnh sâu ở nhiệt độ - 20°C và - 80°C trong thời gian 12h. Tiến hành đông khô sinh khối các chủng giống vi sinh vật trong máy sấy đông khô chân không ALPHA 1-2 LD plus ở nhiệt độ bình ngưng -51°C và áp suất buồng 5 Pa trong 24 giờ [14], [15]. Đối chứng là mẫu đông khô sinh khối tế bào không qua xử lý lạnh sâu. Xác định tỉ lệ sống sót của mỗi chủng trên cơ sở đánh giá mật độ vi sinh vật trước và sau đông khô theo phương pháp đếm số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/mL) trên môi trường Gause 1 dịch thể có bổ sung thêm thạch ở thời điểm 24 giờ sau khi xử lý lạnh sâu và sau khi đông khô mẫu [2], [14]. Để phục hồi chủng giống sau khi xử lý lạnh sâu/ đông khô và sau thời gian bảo quản, các ống mẫu được bù nước đến thể tích ban đầu bằng cách bổ sung 200  $\mu$ L dung dịch đệm PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, nước cất 1 lít), ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút trước khi tiến hành kiểm tra [2].

### 2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất bảo vệ đến tỷ lệ sống sót của vi sinh vật sau đông khô

Chuẩn bị các ống lưu trữ lạnh tế bào Cryotube chứa sinh khối mỗi chủng vi sinh vật nghiên cứu, bổ sung 200  $\mu$ L dung dịch muối NaCl 0,9% đối với mẫu đối chứng và 200  $\mu$ L dung dịch chất bảo vệ gồm skim milk, trehalose, lactose, sucrose (10%, w/v) đối với mẫu thí nghiệm. Tiến hành tiền xử lý lạnh sâu sinh khối các chủng vi sinh vật ở nhiệt độ - 80°C trong thời gian 12 giờ, đông khô mẫu sinh khối vi sinh vật và xác định tỉ lệ sống sót của mỗi chủng ở thời điểm 24 giờ sau đông khô trên cơ sở đánh giá mật độ vi sinh vật trước và sau đông khô theo phương pháp mô tả ở trên [2].

### 2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp các chất bảo vệ đến tỷ lệ sống sót của vi sinh vật sau đông khô

Chuẩn bị mẫu sinh khối các vi sinh vật trong ống lưu trữ lạnh tế bào Cryotube, bổ sung 200  $\mu$ L dung dịch muối 0,9% NaCl đối với mẫu đối chứng và 200  $\mu$ L hỗn hợp các chất bảo vệ gồm: CT1: Trehalose 10% + skim milk 10%; CT2: Trehalose 10% + skim milk 10% + NaCl 0,9%; CT3: Trehalose 10% + skim milk 10% + natri glutamat 1%; CT4: Trehalose 10% + skim milk 10% + natri glutamat 1% + NaCl 0,9%. Tiến hành tiền xử lý lạnh sâu sinh khối các chủng vi sinh vật ở nhiệt độ - 80°C trong thời gian 12 giờ, đông khô mẫu sinh khối vi sinh vật và xác định tỉ lệ sống sót của mỗi chủng ở thời điểm 24 giờ sau đông khô trên cơ sở đánh giá mật độ vi sinh vật trước và sau đông khô theo phương pháp mô tả ở trên [2], [17].

### 2.2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Tỉ lệ sống sót của mẫu chủng giống vi sinh vật được xác định là tỷ lệ phần trăm của đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/mL) được tạo thành so với mật độ vi sinh vật ban đầu và được tính toán theo công thức [14], [17]:

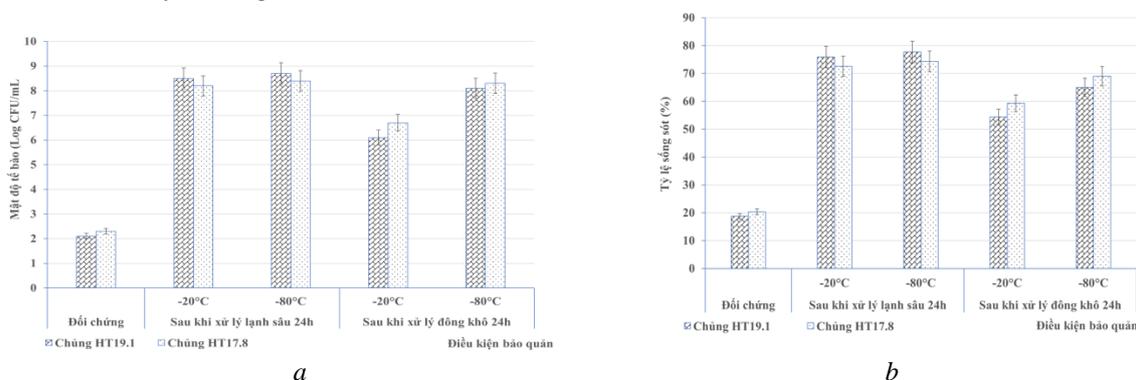
$$\% \text{ Sống sót} = \frac{\text{Tế bào sống sót sau bảo quản (CFU/mL)}}{\text{Tế bào sống trước bảo quản (CFU/mL)}} \times 100\%$$

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê sinh học trên phần mềm Excel 2010.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Ảnh hưởng tiền xử lý lạnh sâu tới khả năng sống sót của chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô

Kết quả đánh giá tác dụng của xử lý lạnh sâu trước khi đông khô đến tỷ lệ sống sót của các vi sinh vật nghiên cứu thể hiện ở Hình 1a và 1b cho thấy, khi các tế bào được xử lý lạnh sâu ở  $-80^{\circ}\text{C}$  hoặc  $-20^{\circ}\text{C}$  thì tỷ lệ sống sót sau quá trình đông khô của cả hai chủng đều cao hơn so với đối chứng mẫu không qua xử lý lạnh sâu, đạt 67% với chủng HT19.1 và 69% với chủng HT17.8 khi xử lý lạnh sâu ở  $-80^{\circ}\text{C}$  và đạt 54% với chủng HT19.1, 59% với chủng HT17.8 khi xử lý lạnh sâu ở  $-20^{\circ}\text{C}$  so với 18% với HT19.1, 59% và 20% với chủng HT17.8 ở công thức không xử lý lạnh sâu. Mật độ các chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau khi xử lý lạnh sâu ở  $-80^{\circ}\text{C}$  đạt  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL và  $2,3 \times 10^8$  CFU/mL, trong khi mật độ các chủng này chỉ đạt  $1,1 \times 10^6 - 3,2 \times 10^6$  CFU/mL khi xử lý lạnh sâu ở  $-20^{\circ}\text{C}$ . Như vậy, xử lý lạnh sâu ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho tỷ lệ sống sót của các chủng xạ khuẩn sau đông khô cao hơn so với xử lý lạnh sâu ở  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kết quả nghiên cứu tương tự cũng đã được Zhao và cộng sự (2005) công bố và xác định mẫu vi khuẩn *Lactobacillus brevis* được xử lý lạnh sâu ở  $-65^{\circ}\text{C}$  có tỷ lệ sống sót sau đông khô đạt 65% cao hơn so với xử lý lạnh sâu ở  $-20^{\circ}\text{C}$  (tỷ lệ sống sót đạt 46%) [4].



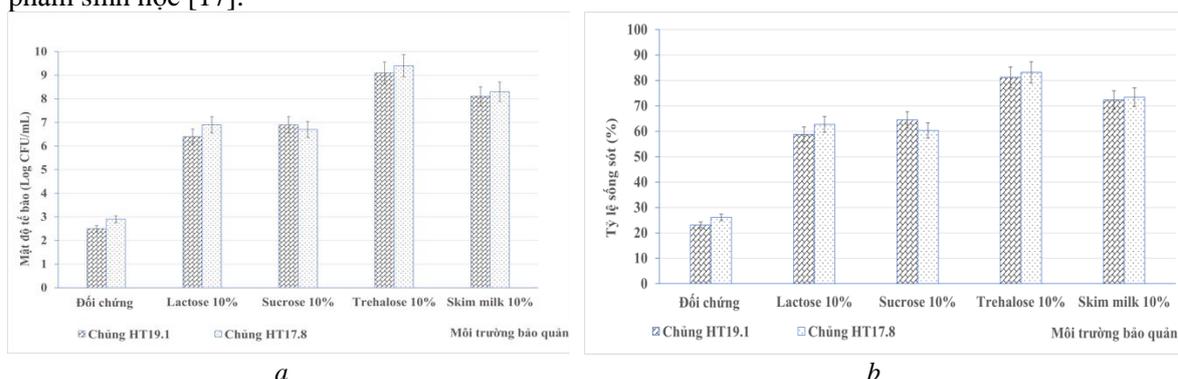
**Hình 1.** Ảnh hưởng của tiền xử lý lạnh sâu tới (a) mật độ (Log CFU/mL) và (b) tỷ lệ sống sót (%) của các mẫu đông khô chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8

### 3.2. Ảnh hưởng của các chất bảo vệ tới khả năng sống sót của chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá tác động riêng rẽ của việc sử dụng lactose, sucrose, trehalose và skim milk (10%, w/v) như là chất bảo vệ đối với khả năng sống sót của chủng xạ khuẩn nghiên cứu so với đối chứng (chỉ sử dụng nước muối sinh lý khử trùng NaCl 0,9%). Các mẫu được xử lý lạnh sâu ở cùng điều kiện  $-80^{\circ}\text{C}$  trong 12h trước khi chuyển tiếp sang thiết bị đông khô. Kết quả nghiên cứu tác dụng của các chất bảo vệ đến tỷ lệ sống sót của các chủng xạ khuẩn thể hiện ở hình 2a và 2b cho thấy có sự khác biệt về khả năng tồn tại của các chủng xạ khuẩn sau đông khô khi sử dụng các chất bảo vệ khác nhau, trong đó tỷ lệ sống sót cao nhất được xác định khi sử dụng chất bảo vệ là trehalose đạt 81% và 83% cao hơn so với sử dụng skim milk (72% và 73%), sucrose (64% và 60%), lactose (59% và 63%) và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng sử dụng NaCl 0,9% (23% và 26%). Mật độ chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô sử dụng trehalose đạt  $1,5 \times 10^9$  CFU/mL và  $3,5 \times 10^9$  CFU/mL. Sử dụng chất bảo vệ skim milk 10% mật độ chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô nằm trong khoảng  $1,5 - 2,3 \times 10^8$  CFU/mL.

Một số nghiên cứu đã báo cáo tác động tích cực của trehalose so với một số chất bảo vệ khác đối với sự tồn tại của vi sinh vật trong bảo quản lạnh sâu và đông khô [4], [5], [16] và xác định trehalose 10% đã làm tăng tỷ lệ sống sót của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus brevis* và *Oenococcus oeni* lên 56,8% và 40,2% so với lactose, sucrose, maltose, glucose, fructose [4]. Điều này được lý giải có thể do tác động liên kết giữa phân tử đường trehalose và các nhóm đầu phân cực của phân tử phospholipid kép ở trên màng tế bào giúp bảo vệ màng tế bào. Ngược lại, trong trường hợp không sử dụng chất bảo quản trehalose hay các chất bảo vệ khác, các tế bào bị tổn thương sau khi làm lạnh sâu và đông khô do sự hình thành tinh thể băng, tỷ lệ sống sót ghi nhận

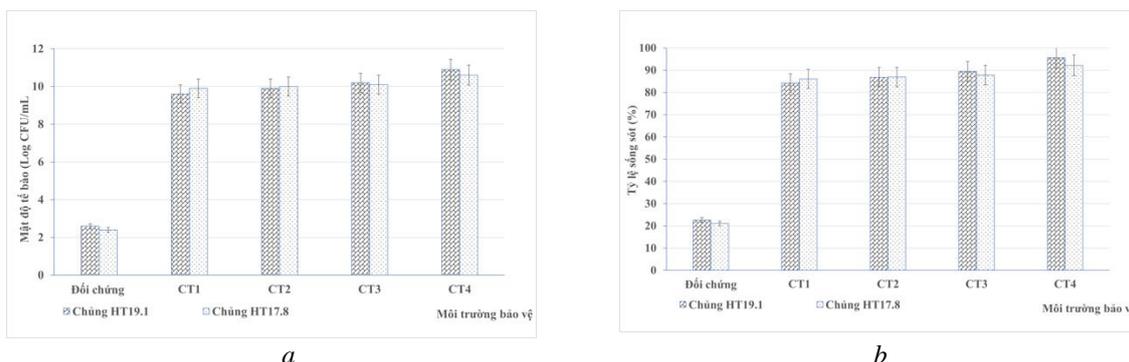
chỉ đạt 8,7 - 19% so với trước khi bảo quản đối với các mẫu đối chứng chỉ bổ sung NaCl 0,9% [8]-[10]. Ngoài ra, loại đường này cũng được biết đến như một chất chống oxy hóa bảo vệ màng chống lại stress oxy hóa [6], [7]. Bên cạnh đó, skim milk cũng là một chất bảo vệ được sử dụng phổ biến trong bảo quản vi sinh vật do thành phần protein có tác dụng bao phủ các tế bào và cân bằng ổn định các thành phần cấu trúc màng tế bào trong quá trình đông khô. Một đặc điểm khác của skim milk là khả năng làm khô dễ dàng hơn và cung cấp năng suất chất khô cao hơn nên cũng thường được lựa chọn sử dụng làm chất bảo vệ chủng giống vi sinh trong sản xuất chế phẩm sinh học [17].



**Hình 2.** Ảnh hưởng của chất bảo vệ tới (a) mật độ tế bào (Log CFU/mL) và (b) tỷ lệ sống sót (%) của chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô

### 3.3. Ảnh hưởng của các công thức bảo quản khác nhau tới khả năng tồn tại của chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô

Với mục tiêu xây dựng công thức môi trường bảo vệ sử dụng hiệu quả cho cả chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 khảo sát, hướng tới là bảo quản lâu dài và duy trì được khả năng sống sót cao, hai chủng xạ khuẩn được thử nghiệm bảo quản với 4 công thức môi trường thử nghiệm trên thiết bị đông khô chuyên dụng của đơn vị (áp dụng bước tiền xử lý lạnh sâu ở  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Kết quả biểu hiện tại hình 3a và 3b chỉ ra cả 4 công thức môi trường bảo vệ sử dụng đều cho hiệu quả bảo vệ cao, thể hiện ở tỉ lệ sống sót của cả 2 chủng giống sau 24 giờ xử lý đông khô đạt trên 80%, cao hơn gần 4 lần so với mẫu đối chứng chỉ đạt 21 - 23%. Trong đó, công thức môi trường bảo vệ CT4 gồm các thành phần: Trehalose 10% + skim milk 10% + natri glutamat 1% + NaCl 0,9% cho hiệu quả bảo vệ cao nhất, thể hiện ở tỉ lệ sống sót đạt 95% đối với mẫu xạ khuẩn HT19.1 và 92% đối với mẫu HT17.8, giá trị Log(CFU/mL) đạt 10,9 và 10,6, tương ứng mật độ tế bào đạt  $8,3 \times 10^{10}$  CFU/mL và  $6,5 \times 10^{10}$  CFU/mL. Điều này cho thấy, việc sử dụng kết hợp bổ sung đồng thời các chất bảo vệ là trehalose và skim milk cùng với NaCl 0,9% và natri glutamat 1% có tác dụng nâng cao tỉ lệ sống sót của hai chủng nghiên cứu sau đông khô tốt hơn so với các mẫu được xử lý với CT1, CT2, CT3 và so với mẫu được xử lý với các chất đơn lẻ (hình 2a và hình 2b). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với một số nghiên cứu đã chỉ ra, môi trường bảo vệ có sự kết hợp đồng thời của một số chất bảo vệ cho tỷ lệ sống sót cao hơn khi sử dụng môi trường chỉ chứa riêng lẻ một chất trong quá trình bảo quản đông khô [1], [3], [11]. Bellali (2020) công bố việc sử dụng 10% trehalose làm chất bảo vệ giúp duy trì khả năng sống sót đạt 74%, trong khi đó sự kết hợp của trehalose với skim milk và natri glutamat làm tăng khả năng sống sót của chủng vi khuẩn lên 85% sau khi đông khô [2]. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp của trehalose với skim milk và natri glutamat (CT3) cũng cho hiệu quả đông khô cao, thể hiện ở tỷ lệ sống sót sau 24 giờ đông khô chủng xạ khuẩn HT19.1 đạt 89% và chủng xạ khuẩn HT17.8 đạt 87%. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi ghi nhận việc bổ sung thêm một tỷ lệ NaCl 0,9% (ở CT4) có tác dụng nâng cao hiệu quả của bảo quản đông khô đối với các chủng giống này hơn so với khi xử lý với CT3 (hình 3a và hình 3b).



**Hình 3.** Ảnh hưởng của các công thức phối hợp các chất bảo quản tới (a) mật độ tế bào (Log CFU/mL) và (b) tỷ lệ sống sót (%) của chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 sau đông khô

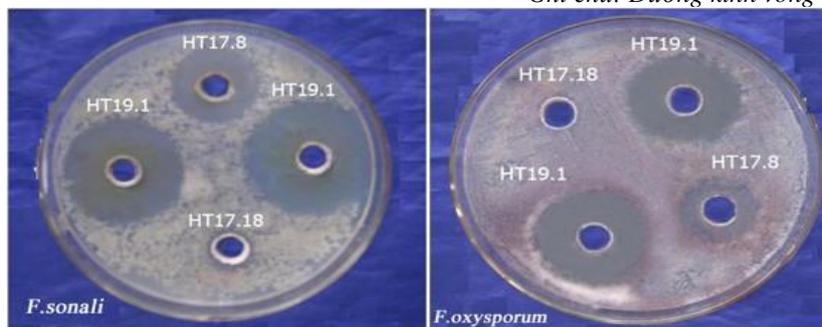
**3.4. Đánh giá chất lượng bảo quản chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 theo thời gian**

Các ống giống sau khi đông khô được bảo quản trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng và được theo dõi chất lượng bảo quản trong 12 tháng. Chất lượng bảo quản chủng giống chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 theo thời gian được đánh giá dựa trên các tiêu chí về khả năng tồn tại của chủng giống trong các ống đông khô và hoạt tính kháng sinh xác định theo phương pháp khuếch tán trên thạch (hình 4). Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy, mật độ tế bào ngay sau khi xử lý đông khô đều đạt trên  $10^{10}$  CFU/mL. Tại các thời điểm kiểm tra 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng sau đông khô, mật độ tế bào vẫn duy trì ở mức  $> 10^{10}$  CFU/mL, từ tháng thứ 9 đến tháng thứ 12 mật độ tế bào vẫn còn duy trì ở mức  $> 10^9$  CFU/mL. Đồng thời, kết quả đánh giá hoạt tính kháng sinh theo thời gian bảo quản cho thấy chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 vẫn duy trì được hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm định, thể hiện thông qua đường kính ức chế vi sinh vật kiểm định đạt  $\geq 15$  mm [12], [13]. Như vậy, trong nghiên cứu này, chất lượng bảo quản 2 chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 theo phương pháp đông khô đảm bảo chất lượng sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng.

**Bảng 1.** Chất lượng bảo quản chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 theo thời gian

Thời gian bảo quản chủng giống	Mật độ tế bào (CFU/mL)		Hoạt tính kháng nấm
	Chủng HT19.1	Chủng HT17.8	
0 giờ	$8,9 \times 10^{10}$	$9,1 \times 10^{10}$	+
1 tháng	$8,3 \times 10^{10}$	$8,8 \times 10^{10}$	+
3 tháng	$8,2 \times 10^{10}$	$8,4 \times 10^{10}$	+
6 tháng	$8,0 \times 10^{10}$	$8,1 \times 10^{10}$	+
9 tháng	$8,9 \times 10^9$	$8,8 \times 10^9$	+
12 tháng	$7,4 \times 10^9$	$7,1 \times 10^9$	+

Ghi chú: Đường kính vòng ức chế  $\geq 15$  mm.



**Hình 4.** Hoạt tính kháng nấm của các chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 (Đối chứng -: chủng xạ khuẩn HT17.18)

#### 4. Kết luận

Việc tiền xử lý mẫu lạnh sâu ở nhiệt độ - 80°C (bổ sung skim milk 10%) cho tỷ lệ sống sót của 2 chủng xạ khuẩn HT19.1 và HT17.8 cao hơn so với ở - 20°C và cao hơn đối chứng không xử lý lạnh sâu, tỷ lệ sống sót đạt 65% với chủng xạ khuẩn HT19.1 và 69% với chủng xạ khuẩn HT17.8.

Mẫu vi sinh vật được xử lý lạnh sâu trước đông khô ở - 80°C kết hợp với sử dụng các chất bảo vệ, gồm lactose, sucrose, trehalose, skim milk (10%) giúp nâng cao tỷ lệ sống sót của 2 chủng nghiên cứu, đạt 59% và 83%, cao hơn có ý nghĩa so với 23% và 26% ở công thức đối chứng. Trong đó, trehalose cho hiệu quả bảo quản cao nhất, đạt tỷ lệ sống sót 81% với mẫu xạ khuẩn HT19.1 và 83% với mẫu xạ khuẩn HT17.8.

Việc sử dụng phối hợp các chất bảo vệ gồm: trehalose 10%, skim milk 10%, natri glutamat 1% và NaCl 0,9% kết hợp tiền xử lý lạnh sâu ở - 80°C cho hiệu quả bảo quản tốt nhất, nâng cao tỷ lệ sống sót lên 95% với mẫu xạ khuẩn HT19.1 và 92% với mẫu xạ khuẩn HT17.8, tương ứng mật độ vi sinh vật sau đông khô đạt  $\geq 10^{10}$  CFU/mL sau 12 tháng theo dõi. Chất lượng mẫu vi sinh vật đông khô đảm bảo sau 12 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ phòng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Merivaara *et al.*, "Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm," *Journal of Controlled Release*, vol. 336, pp. 480-498, 2021.
- [2] S. Bellali *et al.*, "A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying," *Microbiological Research*, vol. 236, p. 126454, 2020, doi:10.1016/j.micres.2020.126454.
- [3] M. Abadias *et al.*, "Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 65, pp. 173-182, 2001.
- [4] G. Zhao and G. Zhang, "Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 99, pp. 333-338, 2005.
- [5] D. Spadaro *et al.*, "Effect of culture age, protectants, and initial cell concentration on viability of freeze-dried cells of *Metschnikowia pulcherrima*," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 56, pp. 809-815, 2010.
- [6] J. G. Streeter, "Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, pp. 484-491, 2003.
- [7] R. S. Herdeiro *et al.*, "Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1760, pp. 340-346, 2006, Tdoi:10.1016/j.bbagen.2006.01.010.
- [8] S. Miao, "Effect of disaccharides on survival during storage of freeze dried probiotics," *Dairy Science and Technology*, vol. 88, pp. 19-30, 2008.
- [9] Y. Miyamoto-Shinohara *et al.*, "Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage," *Cryobiology*, vol. 41, pp. 251-255, 2000.
- [10] R. Asada *et al.*, "Trehalose accumulation and radiation resistance due to prior heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*," *Arch Microbiol*, vol. 204, p. 275, 2022, doi: 10.1007/s00203-022-02892-z.
- [11] R. Brogna *et al.*, "Increasing storage stability of freeze-dried plasma using trehalose," *PLOS ONE*, vol. 15, p. 0234502, 2020, doi:10.1371/journal.pone.0234502.
- [12] T. T. Do, D. B. Ngo, N. M. Nghiem, T. N. M. Cung, D. H. Le, and T. D. C. Vi, "Taxonomic characteristics of actinomycetes strains HT19.1 containing the antibiotic ability against pathogenic fungi in plants," *Journal of biotechnology*, vol. 11, pp. 755-760, 2013.
- [13] T. T. Do and T. D. C. Vi, "Taxonomic characteris of actinomycetes strains having the antibiotic ability against pathogenic fungi attacking tea in Thai Nguyen," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 107, pp. 97-102, 2013.
- [14] S. Alonso, "Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures," *Food Engineering Series*, vol. 2, pp. 7-33, 2016.
- [15] T.T. Do, V. T. Le, and B. George, "Effects of freezing treatments and protective agents on the stability of *Weissella cibaria* TSL24.10 after freeze-drying," *Moscow University Biologica Sciences Bulletin*, vol. 77, pp. 272-278, 2022.
- [16] Q. H. Vu and B. May, "Influence of protectants on *Lactobacillus plantarum* subjected to freeze-drying," *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 14, pp. 1082-1088, 2016.
- [17] Y. W. Chin *et al.*, "Combinatorial Effects of Protective Agents on Survival Rate of the Yeast Starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying," *Microorganisms*, vol. 9, p. 613, 2021.