

# NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN NUÔI CẤY VÀ CÁC CHẤT BẢO VỆ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG NẤM SỢI SAU BẢO QUẢN ĐÔNG KHÔ

Nguyễn Thị Hiếu Thu<sup>1\*</sup>, Trần Khánh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Kim Thanh<sup>1</sup>, Ngô Cao Cường<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## TÓM TẮT

Nghiên cứu bảo quản dài hạn các chủng vi sinh vật có ý nghĩa rất lớn trong công tác xây dựng và duy trì các bộ sưu tập nguồn gen vi sinh vật có giá trị. Trong nghiên cứu này, hai chủng nấm sợi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 và *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 phân lập từ các hòm gỗ được tiến hành bảo quản bằng phương pháp đông khô. Hai chủng được nuôi cấy trên môi trường thạch và thu hoạch sinh khối cho đông khô vào ba thời điểm 7, 10 và 13 ngày sau cấy. Các công thức chất bảo vệ được sử dụng bao gồm skim milk 10%, skim milk 12% và trehalose 7%, skim milk 10% và inositol 5%. Kết quả cho thấy, sau 3 tháng bảo quản bằng đông khô hai chủng nấm sợi cho tỷ lệ sống sót đạt 100%. Thời gian thu hoạch sinh khối thích hợp cho bảo quản đông khô của cả hai chủng là 7 - 10 ngày sau cấy. Khuẩn lạc của chủng BS3.2 sinh trưởng tốt hơn với công thức chất bảo vệ skim milk 10% và inositol 5%, skim milk 12% và trehalose 7%. Khuẩn lạc của chủng BSK6.1 sinh trưởng tốt hơn với công thức chất bảo vệ skim milk 12% và trehalose 7%, hoặc skim milk 10%. Kết quả bước đầu này nhằm mục đích xây dựng quy trình bảo quản hiệu quả đối với hai chủng nấm BS3.2, BSK6.1 và hướng tới áp dụng cho các loài nấm sợi khác.

**Từ khóa:** Bảo quản dài hạn, đông khô, chất bảo vệ, nấm trên gỗ, phá hủy sinh học.

## MỞ ĐẦU

Vi sinh vật có khả năng trao đổi chất rất linh hoạt, do đó có thể dễ dàng phát triển trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau. Chính vì vậy, vi sinh vật trong đó có nấm sợi có thể làm hỏng vật liệu gốc hữu cơ (giấy, da, giấy dầu, hàng dệt hoặc gỗ) và vật liệu gốc vô cơ (thủy tinh, kim loại hoặc đá). Nấm sợi phân bố rộng rãi trong tự nhiên và gây hư hỏng các đồ vật bằng gỗ trong nhiều môi trường khác nhau (El-Gamal *et al.*, 2016). Cấu trúc của gỗ đóng vai trò là cơ chất cho nấm sinh trưởng và phát triển. Do đó, việc thu thập và lưu giữ các chủng nấm sợi gây phá hủy vật liệu gỗ là rất quan trọng trong việc tìm kiếm các biện pháp bảo vệ phù hợp cho loại vật liệu này.

Nhiều phương pháp bảo quản đã được nghiên cứu ứng dụng trên nấm sợi bao gồm những phương pháp đơn giản và ít tốn kém như nuôi cấy liên tục, bảo quản trong dầu khoáng, trong nước, trong đất và trong silica gel. Các phương pháp phức tạp và đòi hỏi trang thiết bị phù hợp như đông khô và bảo quản lạnh trong nitơ lỏng (Ozerskaya *et al.*, 2022). Các nghiên cứu cho thấy không có phương pháp nào là phổ quát để bảo quản các loài vi sinh vật và luôn cần phải cân bằng ưu điểm và nhược điểm của các phương pháp khác nhau. Vì vậy, nên chọn nhiều phương pháp để bảo quản chủng giống và bằng cách này sẽ làm giảm khả năng mất chủng hoặc mất các đặc tính sinh học quan tâm (Ayala-Zermeño *et al.*, 2017).

Đông khô là một kỹ thuật tiềm năng để bảo quản lâu dài và được sử dụng phổ biến tại nhiều cơ sở nghiên cứu và bảo tàng chủng giống vi sinh vật. Hầu hết vi khuẩn và nấm hình thành bào tử hoặc bào tử dính đều tồn tại trong quá trình đông khô (Croan, 2000). Trong đông khô, skim milk được sử dụng phổ biến như chất bảo vệ do có tác dụng bao phủ và làm ổn định các thành phần cấu trúc màng tế bào cũng như cung cấp năng lượng cho quá trình phục hồi của vi sinh vật (Chin *et al.*, 2021). Bên cạnh đó, một số hợp chất như trehalose, inositol, sodium glutamate... đã được bổ sung nhằm tăng hiệu quả bảo vệ (Tan *et al.*, 2007).

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định thời gian nuôi cấy thích hợp của các chủng nấm khi đưa vào bảo quản và tìm kiếm chất bảo vệ thích hợp cho việc đông khô và bảo quản sau đông khô các chủng này. Từ các kết quả bước đầu này sẽ xây dựng quy trình bảo quản các chủng nấm sợi nói chung bằng phương pháp đông khô nhằm nâng cao hiệu quả lưu giữ chủng giống vi sinh vật phục vụ nghiên cứu ứng dụng tại Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng nấm sợi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 và *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 phân lập từ vật liệu gỗ tại kho K620 (Thái Nguyên) được lưu giữ tại Phòng Vi sinh, Phân viện Công nghệ sinh học (Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga).

Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar PDA (Himedia, Ấn Độ) và lưu giữ ở 4°C. Một số hoá chất dùng trong nghiên cứu có xuất xứ Ấn Độ, Canada, Đức.

### Phương pháp

#### Phương pháp đông khô

Các chủng nấm sợi được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa ở 30°C. Bổ sung 3 mL dung dịch chất bảo vệ lên bề mặt tảo nấm và dùng que cấy vô trùng cào nhẹ để thu bào tử và sợi nấm. Chuyển toàn bộ dung dịch bảo vệ chứa bào tử và sợi nấm sang ống Eppendorf 5 mL, vortex thật kỹ. Hút 200 µL dịch huyền phù cho vào ống cryovial 2 mL vô trùng, đông lạnh ở -80°C trong 2 giờ. Tiến hành đông khô sinh khối nấm sợi trong máy đông khô chân không ALPHA 1-2 LD plus ở nhiệt độ bình ngưng -45°C và áp suất buồng 5 Pa trong 24 giờ. Các ống cryovial được đậy nắp vận và bảo quản ở nhiệt độ +4°C.

Các chủng nấm được đưa vào bảo quản tại các thời điểm 7 ngày, 10 ngày và 13 ngày tuổi. Các công thức chất bảo vệ được sử dụng bao gồm: CT1 (skim milk 10%), CT2 (skim milk 12% và trehalose 7%), CT3 (skim milk 10% và inositol 5%) (Ryan & Smith, 2007; Tan *et al.*, 2007; Ozerskaya *et al.*, 2013). Trehalose và inositol được khử trùng riêng ở 121°C trong 15 phút. Skim milk được khử trùng 2 lần ở 105°C trong 20 phút.

#### Đánh giá khả năng tồn tại và sinh trưởng sau bảo quản

Trước khi tiến hành đông khô, đặc điểm hình thái và sinh trưởng của các chủng nấm trên đĩa thạch Sabouraud Dextrose Agar SDA (Merck, Đức) được xác định và được sử dụng làm tiêu chuẩn tham khảo để đánh giá khả năng sống sót, độ thuần khiết, hình thái, màu sắc khuẩn lạc... của chúng sau khi đông khô và theo thời gian bảo quản. Hút 10 µL dịch huyền phù sinh khối nấm và các chất bảo vệ nhỏ vào giữa đĩa thạch SDA, ủ đĩa ở 30°C và theo dõi khả năng sinh trưởng ở thời điểm 4, 7, 10 và 13 ngày. Khả năng sống sót và độ thuần khiết của các chủng nấm được theo dõi tại thời điểm sau đông khô và sau 1 và 3 tháng bảo quản. Để phục hồi chủng giống, các ống mẫu đông khô được bổ sung 200 µL dung dịch đệm Phosphate Buffered Saline 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. Hút 10 µL dịch hoàn nguyên nhỏ vào giữa đĩa thạch SDA, ủ đĩa ở 30°C và theo dõi khả năng sinh trưởng ở các thời điểm tương tự như mẫu trước đông khô. Chụp ảnh và đo đường kính khuẩn lạc. Đường kính tảo nấm được tính bằng hiệu số D - d (trong đó D là đường kính khuẩn lạc (mm), d là đường kính của giọt dịch). Nếu sự phát triển, màu sắc và hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm giống với các đặc điểm được ghi nhận trước đông khô có nghĩa là đã bảo tồn khả năng sống sót của các chủng này. Độ thuần khiết của các chủng nấm mốc cũng được đánh giá khi xác định khả năng sống sót (Berikten, 2021).

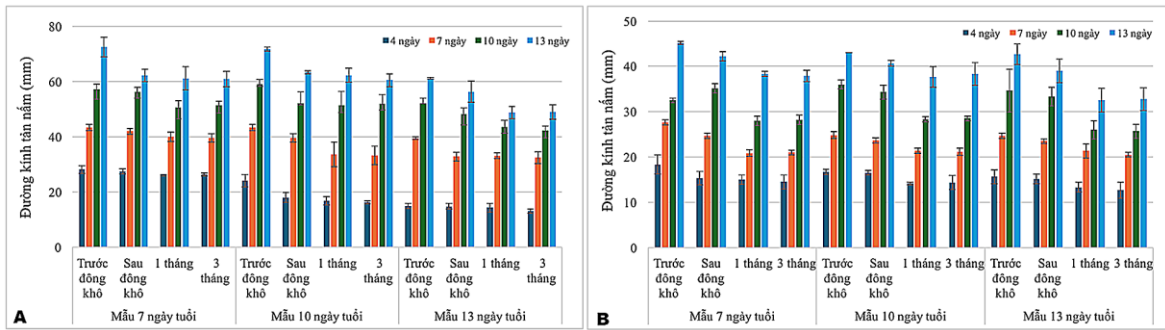
#### Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2017 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

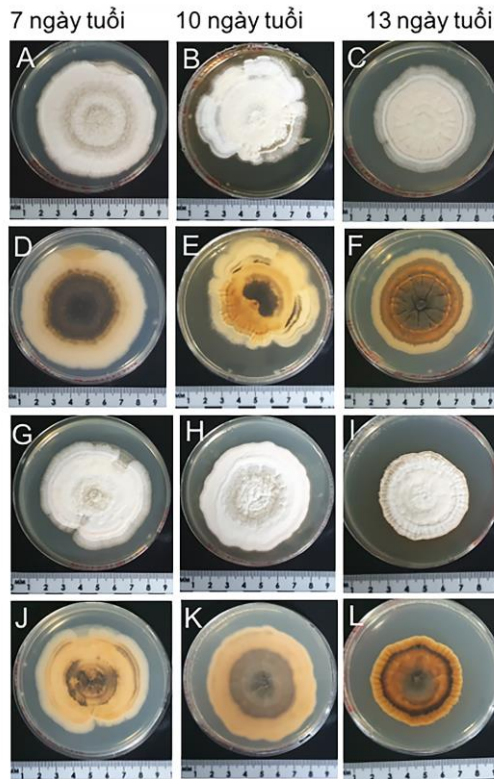
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm sau đông khô

Nhằm lựa chọn được thời điểm thu sinh khối thích hợp nhất cho bảo quản đông khô, các chủng nấm sợi được nuôi cấy trên đĩa thạch PDA và sinh khối nấm được đưa vào bảo quản ở các độ tuổi 7, 10 và 13 ngày sau cấy. Kết quả cho thấy độ tuổi của hai chủng nấm nghiên cứu có ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của khuẩn lạc của chúng ở các thời điểm kiểm tra khác nhau sau đông khô (Hình 1). Trên môi trường SDA, chủng BS3.2 có khuẩn lạc dạng tảo tròn, màu trắng, bề mặt bông xốp. Chủng BSK6.1 có khuẩn lạc dạng tảo tròn, màu xanh lục xám, viền ngoài màu trắng, bề mặt dạng bột mịn, phẳng. Kiểm tra sau khi đông khô 48 giờ và sau bảo quản 1 và 3 tháng cho thấy, cả hai chủng vẫn đảm bảo khả năng sống sót 100% và giữ được các đặc điểm hình thái đặc trưng (Hình 2). Quan sát thí nghiệm cho thấy ở 4 ngày và 7 ngày sau khi hoàn nguyên mẫu đông khô và cấy dịch hoàn nguyên lên đĩa thạch SDA, có sự khác nhau rõ rệt về tốc độ phát triển giữa các mẫu đông khô ở cả ba thời điểm kiểm tra đối với cả 2 chủng nấm. Sau 10 và 13 ngày theo dõi, khuẩn lạc từ mẫu đông khô hoàn nguyên của mẫu 7 ngày tuổi và 10 ngày tuổi có tốc độ phát triển tương đương nhau và cao hơn hẳn so với mẫu 13 ngày tuổi. Nhìn chung, đối với cả hai chủng độ tuổi nấm 7 - 10 ngày là phù hợp nhất khi tiến hành bảo quản bằng phương pháp đông khô.



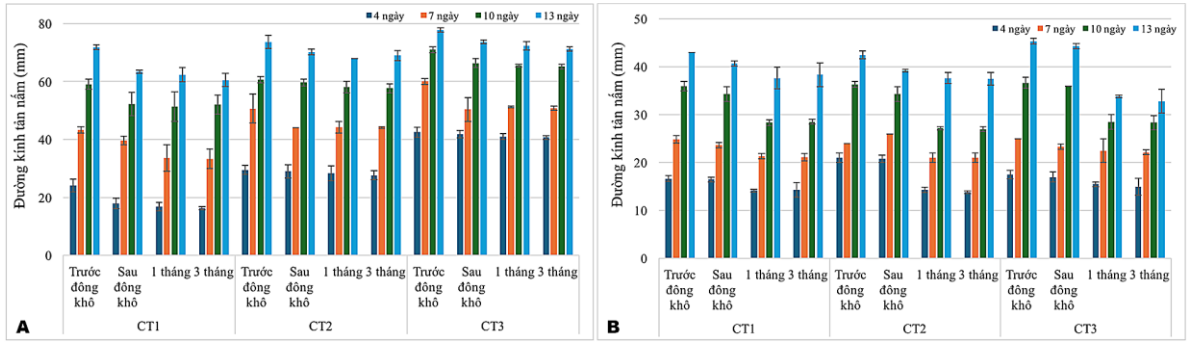
Hình 1. Đường kính hệ sợi của mẫu 7 ngày tuổi, 10 ngày tuổi và 13 ngày tuổi của chủng BS3.2 (A) và BSK 6.1 (B) trước và sau đông khô tại các thời điểm theo dõi khác nhau



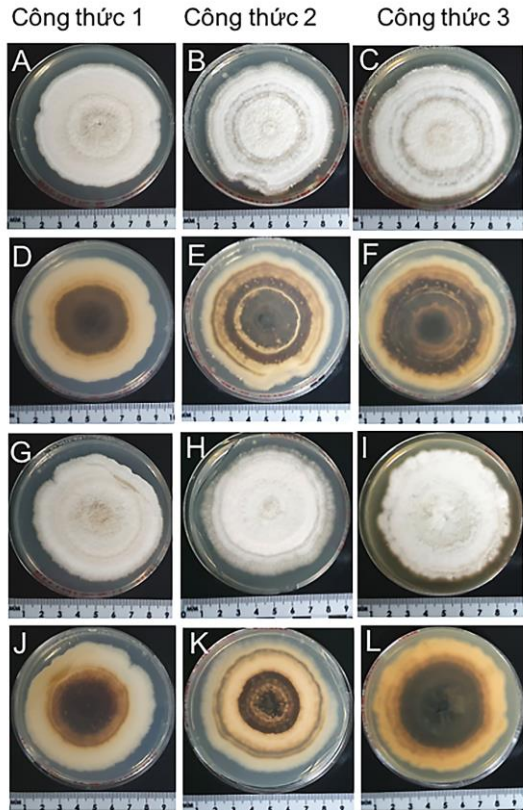
Hình 2. Hình ảnh hệ sợi của chủng BS3.2 ở các độ tuổi khác nhau trước đông khô (A - F) và sau đông khô 3 tháng (G - L) sau 13 ngày theo dõi. Mẫu 7 ngày tuổi trước đông khô (A: mặt trên, D: mặt dưới) và sau đông khô (G: mặt trên, J: mặt dưới). Mẫu 10 ngày tuổi trước đông khô (B: mặt trên, E: mặt dưới) và sau đông khô (H: mặt trên, K: mặt dưới). Mẫu 13 ngày tuổi trước đông khô (C: mặt trên, F: mặt dưới) và sau đông khô (I: mặt trên, L: mặt dưới).

### Ảnh hưởng của các chất bảo vệ đến khả năng sống sót và sinh trưởng của các chủng nấm sau đông khô

Với mục tiêu lựa chọn được công thức dung dịch bảo vệ thích hợp hướng tới bảo quản lâu dài và duy trì được khả năng sống sót cao, hai chủng nấm sợi BS3.2 và BSK6.1 được thử nghiệm bảo quản với ba công thức chất bảo vệ khác nhau. Kết quả tại hình 3 chỉ ra cả ba công thức chất bảo vệ sử dụng đều cho hiệu quả bảo vệ cao, thể hiện ở tỉ lệ sống sót của cả 2 chủng giống sau đông khô và sau bảo quản 1 và 3 tháng đạt 100%. Đối với chủng BS3.2, công thức chất bảo vệ 3 (CT3: skim milk 10%, inositol 5%) và công thức chất bảo vệ số 2 (CT2: skim milk 12%, trehalo 10%) có tốc độ tăng đường kính khuẩn lạc cao hơn đáng kể so với công thức 1 (skim milk 10%). Sau bảo quản 3 tháng, CT3 cho đường kính khuẩn lạc đạt  $40,67 \pm 0,58$  mm và  $71,17 \pm 0,76$  mm; CT2 cho đường kính khuẩn lạc đạt  $26,67 \pm 1,53$  mm và  $69,00 \pm 1,73$  mm ở ngày thứ 5 và ngày 14 sau cấy. Trong khi đó, ở CT1, đường kính khuẩn lạc chỉ đạt  $16,33 \pm 0,58$  mm và  $60,50 \pm 2,29$  mm ở cùng thời điểm kiểm tra (Hình 3A, Hình 4).



Hình 3. Đường kính hệ sợi của chủng BS3.2 (A) và BSK 6.1 (B) trước và sau đông khô với các công thức chất bảo vệ khác nhau



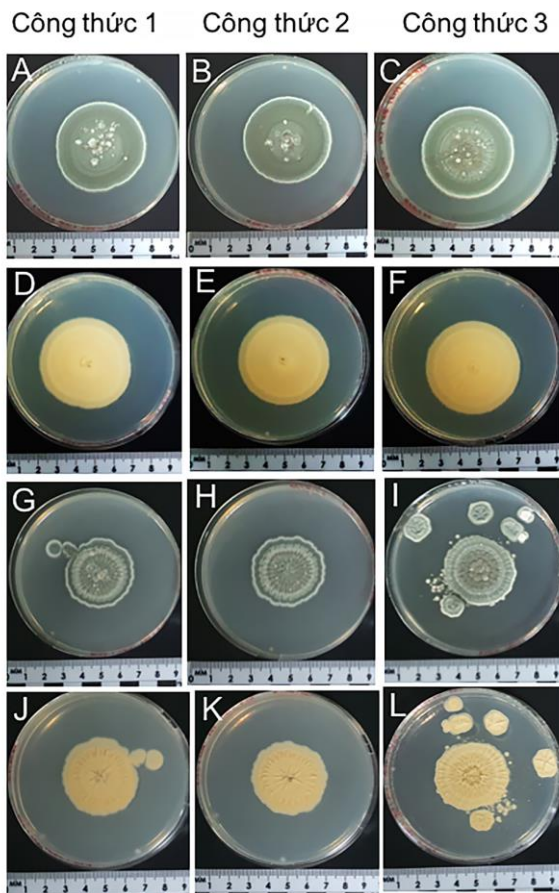
Hình 4. Hình ảnh hệ sợi của chủng BS3.2 trước đông khô (A - F) và sau đông khô 3 tháng (G - L) với các công thức chất bảo vệ khác nhau sau 14 ngày theo dõi. Công thức 1 trước đông khô (A: mặt trên, D: mặt dưới) và sau đông khô (G: mặt trên, J: mặt dưới). Công thức 2 trước đông khô (B: mặt trên, E: mặt dưới) và sau đông khô (H: mặt trên, K: mặt dưới). Công thức 3 trước đông khô (C: mặt trên, F: mặt dưới) và sau đông khô (I: mặt trên, L: mặt dưới).

Công thức chất bảo vệ 2 cũng cho tốc độ sinh trưởng khuẩn lạc cao khi kiểm tra sau đông khô và sau bảo quản 1 và 3 tháng đối với chủng BSK6.1 (Hình 3B). Công thức chất bảo vệ 1 cho hiệu quả tương đương công thức 2. Công thức 3 cho kết quả tốt khi kiểm tra sau khi đông khô. Tuy nhiên, ở thời điểm 1 và 3 tháng bảo quản sau đông khô công thức 3 cho tốc độ sinh trưởng khuẩn lạc thấp hơn hẳn so với 2 công thức còn lại, tương ứng đạt  $33,83 \pm 0,29$  mm và  $32,83 \pm 2,47$  mm (CT3),  $37,67 \pm 2,25$  mm và  $38,33 \pm 2,52$  mm (CT1),  $37,67 \pm 1,15$  và  $37,50 \pm 1,52$  mm (CT2) sau 13 ngày theo dõi (Hình 3B). Các công thức chất bảo quản có ảnh hưởng đến hình thái khuẩn lạc sau đông khô và bảo quản. Cụ thể tại thời điểm 3 tháng sau đông khô, khuẩn lạc ở cả ba công thức chất bảo quản xuất hiện các đường xẻ rãnh từ tâm và các vòng đồng tâm có màu sắc khác nhau, bề mặt khuẩn lạc gồ ghề, dạng hạt hơi lồi ở tâm, nhất là ở công thức 3 (Hình 5).

Hai chủng nấm sợi thể hiện khả năng sống sót 100% sau quá trình đông khô khi chỉ sử dụng skim milk hoặc skim milk kết hợp với inositol hoặc trehalose như chất bảo vệ. Đặc biệt, cả hai chủng có khả năng phục hồi tốt sau đông khô và 3 tháng bảo quản với chất bảo vệ là skim milk kết hợp với trehalose. Trong tự nhiên, trehalose được sản xuất trong các bào tử và bào tử đỉnh của nấm và nấm men để bảo vệ màng và các protein của chúng (Tan *et al.*, 2007). Trehalose nội bào tích lũy trong giai đoạn tăng trưởng ổn định và đóng vai trò dự trữ carbohydrate (Croan, 2000). Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng trehalose là một trong những chất bảo vệ hiệu quả nhất đối với bảo quản vi sinh vật (Han *et al.*, 2022).

Chủng BS3.2 thể hiện khả năng sinh trưởng tốt nhất sau đông khô và 3 tháng bảo quản với công thức chất bảo vệ skim milk kết hợp với inositol nhưng chủng BSK6.1 thì ngược lại. Điều này cho thấy, quy trình bảo quản và khả năng phục hồi có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm phân loại khác nhau thậm chí giữa các loài trong cùng một nhóm (Ibatsam *et al.*, 2012).

Tốc độ sinh trưởng của hai chủng nấm khảo sát bị ảnh hưởng bởi quá trình đông khô và bảo quản tuy nhiên, sự thay đổi về đặc điểm hình thái khuẩn lạc là không lớn. Tóm lại, phương pháp đông khô sử dụng trong nghiên cứu có thể bảo tồn hiệu quả các chủng nấm sợi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 và *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 phân lập từ vật liệu gỗ và có thể áp dụng cho cả nhiều loài nấm sợi khác.



**Hình 5.** Hình ảnh hệ sợi của chủng BSK6.1 trước đông khô (A - F) và sau đông khô 3 tháng (G - L) với các công thức chất bảo vệ khác nhau sau 13 ngày theo dõi. Công thức 1 trước đông khô (A: mặt trên, D: mặt dưới) và sau đông khô (G: mặt trên, J: mặt dưới). Công thức 2 trước đông khô (B: mặt trên, E: mặt dưới) và sau đông khô (H: mặt trên, K: mặt dưới). Công thức 3 trước đông khô (C: mặt trên, F: mặt dưới) và sau đông khô (I: mặt trên, L: mặt dưới).

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định thời gian nuôi cấy ban đầu và công thức chất bảo vệ thích hợp cho đông khô và bảo quản sau đông khô hai chủng nấm sợi *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 và *Aspergillus gracilis* BSK6.1. Thời gian

nuôi cấy ban đầu thích hợp là 7 - 10 ngày trên môi trường thạch PDA ở 30°C. Công thức chất bảo vệ thích hợp đối với chủng *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 là skim milk 10% và inositol 5% hoặc skim milk 12% và trehalose 7%. Công thức chất bảo vệ thích hợp đối với chủng *Aspergillus gracilis* BSK6.1 là skim milk 12% và trehalose 7% hoặc skim milk 10%.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài: Xây dựng bộ cơ sở dữ liệu nguồn gen vi sinh vật của Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga. Mã số SH.N2.01/23.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ayala-Zermeño MA, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, Andrade-Michel GY, Rodríguez-Rodríguez JC, Arredondo-Bernal HC, Montesinos-Matías R (2017). Viability, purity and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods, *Fungal Biol*, doi: 10.1016/j.funbio.2017.07.007.
- Chin YW, Lee S Yu HH, Yang SJ, Kim TW (2021). Combinatorial effects of protective agents on survival rate of the yeast starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. *Microorganisms*, 9(3): 613.
- Croan SC (2000). Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. *Mycologia*, 92(4): 810–817. doi:10.1080/00275514.2000.1206
- El-Gamal R, Nikolaivits E, Zervakis GI, Abdel-Maksoud G, Topakas E, Christakopoulos P (2016). The use of chitosan in protecting wooden artifacts from damage by mold fungi. *Electron J Biotechnol*, 24: 70-78.
- Han D J, Jun SJ, Lee BH, Yoo SH (2022). Cryoprotective effect of turanose on lyophilized *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, L. casei 431. *Food Sci Biotechnol*, 31(3): 343-347.
- Ibatsam K, Rukhsana B, Nasim G (2012). Preservation of *Penicillium* species by lyophilization. *Afr J Food Agric Nutr Dev*, 12(3): 6055-6064.
- Ozerskaya SM, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Eremina SS, Vasilenko AN, Chigineva NI (2013). Long-term preservation of fungal cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): protocols and results. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (pp.17-65). Cham: Springer International Publishing.
- Ozerskaya SM, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Danilogorskaya AA, Pinchuk IP, Vasilenko AN (2022). Various methods of long-term preservation of fungal cultures in all-Russian collection of microorganisms (VKM). In *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (pp. 1-67). Cham: Springer International Publishing.
- Reinprecht L, Vidholdová Z, Iždinský J (2020). Bacterial and mold resistance of selected tropical wood species. *BioResources*, 15(3): 5198.
- Ryan MJ, Smith D (2007). Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. In: Day JG, Stacey GN (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 368 (pp. 127-140). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9).
- Tan CSH, Van Ingen CW, Stalpers JA (2007). Freeze-drying fungi using a shelf-freeze drier. In: Day JG, Stacey GN (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 368 (pp. 119-125). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9).



## EFFECT OF INCUBATION AND LYOPROTECTANTS ON VIABILITY OF WOODEN FUNGI

Nguyen Thi Hieu Thu<sup>1\*</sup>, Tran Khanh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Kim Thanh<sup>1</sup>, Ngo Cao Cuong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

Research on the long-term preservation of microbial strains is significant in setting and maintaining valuable collections of microbial genetic resources. In this study, two strains of filamentous fungi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 and *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 isolated from wooden material for preservation purpose were preserved by freeze-drying. Two strains were cultured on agar dishes and their biomass was harvested for freeze-drying on 7, 10, and 13 day-after-inoculation. Skim milk 10%, skim milk 12% and trehalose 7%, skim milk 10% and inositol 5% were used as protectant formulations. The results showed that after 3 months of freeze-drying preservation, two filamentous fungi strains had a survival rate of 100%. The appropriate time point for biomass harvesting for both strains is 7 - 10 days after incubation. Colonies of strain BS3.2 grew better with skim milk 10% and inositol 5%, skim milk 12% and trehalose 7%. While colonies of strain BSK6.1 grew better with skim milk 12% and trehalose 7%, or skim milk 10%. This preliminary result allows the development of an effective preservation process for the two fungi strains BS3.2, and BSK6.1, and possibly for other filamentous fungi species.

*Keywords:* Biodegradation, long-term preservation, lyophilization, protectant agents, wooden fungi.

---

\* Author for correspondence: Tel: +84-934579181; Email: hieuthu5106@gmail.com