

## NGHIÊN CỨU MÔI TRƯỜNG NHÂN GIỐNG NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris*) THEO HƯỚNG HỮU CƠ

Trần Thị Thắm Hồng<sup>1\*</sup>, Dương Trung Hiếu<sup>1</sup>, Vũ Thị Thu Hương<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Cao đẳng Nông lâm Đông Bắc

\* Email: [tranhong1981qn@gmail.com](mailto:tranhong1981qn@gmail.com)

Ngày nhận bài: 09/05/2022

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 06/10/2022

Ngày chấp nhận đăng: 10/12/2022

### TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định môi trường dinh dưỡng tối ưu để nhân giống cấp 1, cấp 2 (giống dịch lỏng) của nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) theo hướng hữu cơ. Nghiên cứu sử dụng phương pháp phân lập giống gốc của nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) bằng cách cắt mô nấm từ quả thể nấm sạch bệnh, sinh trưởng tốt, khử trùng bằng cồn 70% trong 20 giây và nuôi cấy trên môi trường PDA. Đối với môi trường nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*), thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với ba công thức và ba lần lặp lại. Kết quả thu được cho thấy, môi trường nhân giống cấp 1 giống nấm tối ưu nhất, kết quả hệ sợi nấm phát triển đồng đều, màu trắng, tơ nấm phát triển đối xứng đồng đều tính từ vị trí đặt sợi giống gốc sang môi trường giống cấp 1 là: 30 g/l glucose + 3 g/l pepton đậu nành + 3 g/l cao nấm men + 3 g/l nhộng tằm + 20 g/l agar. Đối với môi trường tối ưu nhân giống nấm cấp 2 (giống dịch lỏng) là: 30 g/l glucose + 4 g/l Pepton đậu nành + 4 g/l cao nấm men + 4 g/l nhộng tằm. Kết quả thu được giống nấm cấp 2 có các cầu nấm nhỏ đường kính 2 mm, đồng đều trong môi trường, mật độ cầu dày 8 -10 cầu/1cm<sup>3</sup>.

**Từ khóa:** *Cordyceps militaris*, giống cấp 1, giống cấp 2, giống gốc, môi trường nhân giống, nấm Đông trùng hạ thảo

### STUDY OF CULTURE MEDIUM FOR ORGANIC-ORIENTED

#### *Cordyceps Militaris*

#### ABSTRACT

The study aimed to determine the isolation and propagation medium for level 1, level 2 (liquid culture) of medicinal mushrooms (*Cordyceps militaris*) in an organic way. For the isolation medium of *Cordyceps militaris*, the mushroom tissue was cut from the fruiting body of the mushroom that was disease-free, well-growing, and cultured on a PDA medium. The sample was sterilized by 70% alcohol for 20 seconds, resulting in thick and uniform growth of mycelium, and no infection. For the primary propagation medium of *Cordyceps militaris*, the experiment used medium: 30g glucose + 3g soybean pepton + 3g yeast extract + 3g silkworm pupae + 20g agar per 1 liter of lip field for optimal results. The mycelium grew uniformly and had a white color, and mycelium grew symmetrically from the location of the original seedling to the primary seed medium. The level 2 propagation medium (liquid culture) was: 30g glucose + 4g Soy Pepton + 4g yeast extract + 4g silkworm pupae per 1 liter of medium for optimal results. The results obtained small fungal cocoons with a diameter of 2mm, uniform in the environment, and the density of the bridge was 8-10 bridges/1cm<sup>3</sup>.

**Keywords:** 1<sup>st</sup> generation, 2<sup>nd</sup> generation, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps* mushroom, culture medium

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Đông trùng hạ thảo là một loại nấm dược liệu quý. Khi loại nấm này phát triển và hình thành quả thể trên ấu trùng (sâu non) của một loài côn trùng thuộc chi *Hepialus*, thường gặp nhất là sâu non của loài *Hepialus armoricanus* được gọi là Đông trùng hạ thảo, hoặc nhộng trùng thảo. Một số loài đáng chú ý là *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris*. Có nhiều hoạt chất sinh học được tìm thấy trong các chủng nấm này như adenosin, cordycepin, polysaccharide, các sterol, protein, acid amin, vitamin và nhiều nguyên tố đa lượng, vi lượng thiết yếu khác với công dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, kháng dòng tế bào ung thư, chống oxy hóa, tăng sản sinh testosterone (Trần Văn Năm & Lê Diệu Trang, 2014).

Tên gọi "đông trùng hạ thảo" là xuất phát từ quan sát thực tế khi thấy vào mùa hè nấm *Cordyceps sinensis* mọc chồi từ đầu con sâu nhô lên khỏi mặt đất. Vào mùa đông, cặp cá thể này giống con sâu (côn trùng), còn đến mùa hè thì chúng trông giống một loài thực vật (thảo mộc) hơn (Trần Văn Năm, 2014).

Từ xa xưa, cùng với Linh chi, Nhân sâm và Tam thất, loại nấm dược liệu quý hiếm Đông trùng hạ thảo này đã được cả thế giới biết đến. Chúng tạo thành "bộ tứ thần dược" có tác dụng rất tốt cho sức khỏe con người. Sách Y học cổ truyền của Trung Quốc từ lâu đã coi Đông trùng hạ thảo là vị thuốc "cải lão hoàn đồng", "hồi xuân, sinh lực", có tác dụng "Bổ phế ích can, bổ tinh điền tủy, chỉ huyết hoá đàm, "Bổ phế ích thận, hộ dưỡng tạng phủ", "Tư âm tráng dương, khu bệnh kiện thân", là loại thuốc "Tư bổ dược thiện", có thể chữa được "Bách hư bách tổn" nên nó được xem là vị thần dược được các vua chúa tin dùng. Mặt khác, các nghiên cứu cổ truyền cũng như các thực nghiệm hiện đại đều xác định, Đông trùng hạ thảo hầu như không có tác dụng phụ đối với cơ thể người cũng như động vật. Dưới góc nhìn của Tây y, khá nhiều những nghiên cứu trên thế giới đều khẳng định Đông trùng hạ thảo nâng cao hiệu quả phòng bệnh của hệ miễn dịch, giải độc thận, tăng cường chức năng gan, tăng khả năng tình dục (Zhang & cs., 2010)

Hiện nay, nhiều đơn vị, doanh nghiệp, tổ chức cá nhân đã nuôi cấy thành công và thương mại hóa nấm Đông trùng hạ thảo (Nguyễn Ngọc Trai, 2017; Nguyễn Văn Sĩ, 2017), tuy nhiên không phải doanh nghiệp nào cũng sản xuất từ đầu đến cuối quy trình. Nhiều công trình nghiên cứu của các tác giả khác nhau đã đưa ra công thức môi trường dinh dưỡng khác nhau và có nhiều môi trường dinh dưỡng được áp dụng thành công (Lê Tuấn Anh, 2020; Cheng et al., 2011). Tuy nhiên, nấm Đông trùng hạ thảo rất nhạy cảm với yếu tố môi trường dinh dưỡng. Để kết hợp được yếu tố môi trường dinh dưỡng và môi trường nuôi phù hợp nhất cho nấm phát triển đòi hỏi người nuôi phải có kinh nghiệm nuôi cấy được rút ra trong quá trình nuôi. Đồng thời, môi trường nhân giống hiện nay vẫn sử dụng các chất vô cơ an toàn thêm vào trong quá trình nuôi cấy, tuy nhiên môi trường nhân giống hữu cơ chưa được đơn vị nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo nào áp dụng trong giai đoạn hiện nay. Giai đoạn nhân giống là giai đoạn quan trọng nhất trong quá trình nuôi nấm Đông trùng hạ thảo, và giai đoạn này còn gặp nhiều khó khăn về quy trình kỹ thuật, môi trường dinh dưỡng nuôi cấy. Hiện đã có những đơn vị sản xuất giống tuy nhiên môi trường nuôi cấy chưa đảm bảo khiến chất lượng giống kém, dẫn đến giai đoạn nuôi quả thể chưa đạt kết quả cao. Nghiên cứu này đưa ra công thức môi trường phân lập và nhân giống cấp 1, cấp 2 nấm Đông trùng hạ thảo hiệu quả nhất làm nền tảng cho giai đoạn sản xuất quả thể nấm Đông trùng hạ thảo hiệu quả nhất. Bên cạnh đó, việc nhân giống theo hướng hữu cơ tạo nền tảng cho giai đoạn nuôi quả thể theo hướng hữu cơ, bởi khi môi trường nhân giống đã là môi trường hữu cơ thì nấm sẽ thích hợp trên môi trường nuôi quả thể cũng theo hướng hữu cơ.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Quả thể nấm Đông trùng hạ thảo do Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Khoa học công nghệ Việt Nam tại địa chỉ số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy Hà Nội cung cấp. Khi chọn quả thể nấm cần chọn quả thể nấm to

khỏe, không nhiễm bệnh khoảng 50 ngày tuổi từ các hộp nấm Đông trùng hạ thảo tươi.

Môi trường nhân giống: PDA, pepton, cao nấm men, nhộng tằm.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### *2.2.1. Phân lập giống gốc từ quả thể nấm Đông trùng hạ thảo*

Từ những hộp nấm khỏe mạnh, không nhiễm bệnh, chọn những quả thể nấm dài, mập, cắt một miếng mô nấm có kích thước 1x1 mm, khử trùng bằng cồn 70% trong thời gian 20 giây.

Mô nấm khử trùng được cấy vào môi trường PDA (đĩa petri) trong thời gian 9-10 ngày (giống gốc được nuôi trong điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 18-20°C).

Môi trường PDA gồm: 200 g/l khoai tây + 20 g/l dextrose + 20 g/l agar.

Môi trường PDA được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, môi trường được chia vào các ống nghiệm, đĩa petri.

### *2.2.2. Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 1*

Giống cấp 1 được nhân lên từ giống gốc, chọn những đĩa giống gốc đạt tiêu chuẩn: sợi nấm phát triển tốt, màu trắng, các sợi nấm phân bố đồng đều để nhân giống cấp 1.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm ba công thức thí nghiệm, mỗi công thức thí nghiệm lặp lại ba lần, mỗi lần thực hiện 30 mẫu, tổng số mẫu khảo sát ở mỗi công thức thí nghiệm là 90 mẫu. Môi trường nhân giống cấp 1 được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Giống cấp 1 được nghiên cứu trên ba công thức môi trường khác nhau như sau:

CT1: Môi trường PDA.

CT2: Môi trường PDA + 3 g/l Pepton đậu nành + 3 g/l cao nấm men + 3 g/l nhộng tằm.

CT3: 30 g/l glucose + 3 g/l Pepton đậu nành + 3 g/l cao nấm men + 3 g/l nhộng tằm + 20 g/l agar.

*Chỉ tiêu theo dõi:*

- Tỷ lệ mẫu không nhiễm trên tổng số mẫu đã đưa vào nuôi cấy (đĩa/tổng số đĩa).

- Thời gian xuất hiện tơ nấm: tính từ ngày đầu tiên khi tơ nấm bắt đầu phát triển (ngày).

- Đường kính khuẩn lạc sau 10 ngày (cm).

- Màu sắc khuẩn lạc: được theo dõi từ khi tơ nấm bắt đầu phát triển đến hết ngày thứ 10.

### *2.2.3. Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 2 (giống dịch lỏng)*

Giống nấm cấp 2 được nhân lên từ giống nấm cấp 1, chọn những đĩa giống cấp 1 đạt tiêu chuẩn dùng để nhân giống cấp 2.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm ba công thức thí nghiệm, mỗi công thức thí nghiệm lặp lại ba lần, mỗi lần thực hiện 30 mẫu, tổng số mẫu khảo sát ở mỗi công thức thí nghiệm là 90. Môi trường nhân giống cấp 2 được đựng trong các chai thủy tinh có kích thước 500ml, môi trường nhân giống được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Giống cấp 2 được nghiên cứu trên ba công thức môi trường khác nhau như sau:

CT1: 30 g/l glucose + 3 g/l Pepton đậu nành + 3 g/l cao nấm men.

CT2: 30 g/l glucose + 3 g/l Pepton đậu nành + 3 g/l cao nấm men + 3 g/l nhộng tằm.

CT3: 30 g/l glucose + 4 g/l Pepton đậu nành + 4 g/l cao nấm men + 4 g/l nhộng tằm.

*Chỉ tiêu theo dõi:*

- Tỷ lệ mẫu không nhiễm (số chai không nhiễm/ tổng số chai) tiến hành đo sau 7 ngày cấy giống;

- Thời gian xuất hiện cầu nấm (ngày);

- Thời gian xuất hiện tơ nấm (ngày);

- Kích thước cầu nấm: lấy ngẫu nhiên 20 cầu nấm/chai tiến hành đo sau 10 ngày cấy giống (cm/cầu);

- Màu sắc và hình thái của cầu nấm: quan sát cảm quan màu sắc chai giống dịch lỏng sau 4-5 ngày.

## **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến quá trình phát triển của giống cấp 1**

Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 1 được bố trí thí nghiệm theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại (giống gốc được phân lập tại phòng thí nghiệm theo quy trình phân lập giống nấm truyền thống) trên cơ sở môi trường nền đối chứng là môi trường

PDA, và các công thức môi trường có bổ sung thêm các dinh dưỡng như pepton, cao nấm men và dịch nhộng tằm với tỉ lệ khác nhau. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 1.

Kết quả thí nghiệm được phân tích trên phần mềm irrstat 5.0 cho thấy, môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát triển của giống nấm cấp 1. Công thức 3 sử dụng đường glucose thay thế đường dextrose, đồng thời bổ sung nhộng tằm trong môi trường dinh dưỡng sẽ cho kết quả tốt nhất. Ở công thức 1, môi trường cơ bản PDA không phù hợp với quá trình nhân giống cấp 1 nấm Đông trùng hạ thảo, sợi nấm có chỗ chuyển vàng do bị thiếu dinh dưỡng (Hình 1).

### 3.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến quá trình phát triển của giống nấm cấp 2 (giống dịch lỏng)

Môi trường dinh dưỡng của nấm là đường, pepton và cao nấm men, ngoài ra còn có thêm các vitamin tổng hợp. Đường glucose ảnh hưởng rất tốt đến sự sinh trưởng của nấm, pepton và cao nấm men là hai thành phần không thể thiếu trong môi trường dinh dưỡng của nấm Đông trùng hạ thảo.

Chọn ra giống cấp 1 đạt tiêu chuẩn ở thí nghiệm trên dùng để nhân giống cấp 2. Thực hiện thí nghiệm với ba công thức khác nhau, các công thức đều có đường glucose, pepton và cao nấm men. Tuy nhiên các công thức lại khác nhau ở thành phần dinh dưỡng bổ sung và tỉ lệ các loại dinh dưỡng. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 2.

Kết quả phân tích trên phần mềm irrstat 5.0 cho thấy, thành phần dinh dưỡng khác nhau cho kết quả khác nhau. Công thức 2 và công thức 3 có bổ sung dịch nhộng tằm cho thấy thời gian tạo cầu nhanh hơn, tuy nhiên ở công thức 3, hàm lượng pepton là 4 g/l và hàm lượng cao nấm men là 4 g/l cho thấy đường kính cầu nhỏ nhất, mật độ cầu cao. Điều này tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tạo quả thể nấm Đông trùng hạ thảo ở giai đoạn tiếp theo. Màu sắc của giống cấp 2 ở công thức 1 và 2 cho màu vàng nhạt chứng tỏ lượng dinh dưỡng trong dung dịch đã hết do giống nấm phát triển cực đại sau 4 ngày, công thức 3 sau 4 ngày màu của dung dịch vẫn vàng sẫm chứng tỏ lượng dinh dưỡng trong dung dịch vẫn còn, sau 5-6 ngày lượng dinh dưỡng sẽ hết toàn bộ. Kết quả cũng cho thấy, thành phần dinh dưỡng không ảnh hưởng đến tỉ lệ nhiễm của mẫu (Hình 1).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến giống nấm cấp 1**

STT	Tỉ lệ mẫu không nhiễm (%)	Thời gian bắt đầu xuất hiện tơ nấm (ngày)	Đường kính khuẩn lạc sau 10 ngày (cm)	Màu sắc khuẩn lạc sau 10 ngày
CT1	98	2	6,2	trắng có chỗ hơi vàng
CT2	97	2	6,5	trắng
CT3	97	2	7,1	trắng

**Bảng 2. Ảnh hưởng của thành phần dinh dưỡng đến sự phát triển giống cấp 2**

STT	Tỉ lệ mẫu không nhiễm (%)	Thời gian bắt đầu xuất hiện cầu giống (ngày)	Đường kính cầu giống sau 5 ngày (mm)	Mật độ cầu giống (số cầu nấm/cm <sup>3</sup> )	Màu sắc chai giống sau 4 ngày
CT1	97	2,5	2,8	4-5	màu vàng nhạt
CT2	97	2,0	2,1	4-5	màu vàng nhạt
CT3	97	1,5	2,0	7-8	màu vàng sẫm



**Hình 1. Giống nấm cấp 1 và cấp 2**

(A. Giống cấp 1 theo CT1; B. Giống cấp 1 theo CT2; C. Giống cấp 1 theo CT3; D. Giống cấp 2 theo CT1; E. Giống cấp 2 theo CT2; F. Giống cấp 2 theo CT3)

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo trong môi trường PDA đảm bảo tiêu chuẩn để thực hiện các nghiên cứu về môi trường dinh dưỡng để nhân giống cấp 1 và giống cấp 2. Kết quả nghiên cứu cho thu được môi trường nhân giống nấm cấp 1 hiệu quả nhất là môi trường: 30 g/l glucose + 3 g/l Pepton đậu nành + 3 g/l cao nấm men + 3 g/l nhộng tằm + 20 g/l agar và công thức môi trường nhân giống nấm cấp 2 (giống dịch lỏng) hiệu quả nhất là: 30 g/l glucose + 4 g/l Pepton đậu nành + 4 g/l cao nấm men + 4 g/l nhộng tằm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cheng, H., Guo, W., Chang, M., Meng, J., & Yang, J. (2011). Study of optimization on liquid fermentation conditions of *Cordyceps militaris* mycelium. *J. Shanxi. Agric. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 125-134.

Lê Tuấn Anh. (2020). *Cordyceps militaris* trên vật chủ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Tập 56, Số 5B (2020)*, 1-5.

Nguyễn Ngọc Trai. (2017). *Bước đầu nghiên cứu quy trình nuôi nấm Đông Trùng Hạ Thảo (Cordyceps militaris) có nguồn gốc Nhật Bản tại Trà Vinh*. Nxb Đại học Trà Vinh.

Nguyễn Văn Sĩ. (2007). *Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam*. Hà Nội: Nxb Y học.

Trần Văn Năm & Lê Diệu Trang. (2014). *Đông trùng hạ thảo, công dụng, xu hướng sản xuất và thương mại*. Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

Zhang, J. Y., Wu, K. L., Duan, J. (2010). Influence of air permeability on growth of *Cordyceps militaris*. *Guangdong Agricultural Science*, 1-5.