

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG NẤM chân dài *Clitocybe maxima* (Gartn. ex Mey.:Fr.) Qué. DẠNG DỊCH THỂ

Ngô Xuân Nghiễn*, Nguyễn Thị Bích Thùy

Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: xuannghien2006@yahoo.com

Ngày gửi bài: 26.07.2016

Ngày chấp nhận: 06.12.2016

TÓM TẮT

Nấm chân dài (*Clitocybe maxima*) là loại nấm ăn có màu nâu sáng, quả thể nấm khi mới xuất hiện có dạng hình que, sau đó xuất hiện mũ nấm. Nấm chân dài còn có tên là nấm măng. Quả thể nấm chân dài có chứa các loại axit amin và các chất khoáng cần thiết cho cơ thể con người. Thí nghiệm nuôi cấy giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể chỉ ra rằng nấm chân dài sinh trưởng tốt nhất trong môi trường bao gồm (CT3: 2 g cao nấm men + 2 g pepton + 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin)/1 lít môi trường. Trên môi trường này tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm chân dài nhanh, sinh khối sợi đạt 33,9 g/1.000ml, mật độ khuẩn lạc cầu lớn. Lượng oxy cung cấp có ảnh hưởng lớn đến sinh khối sợi nấm chân dài, lượng oxy ở mức 0,75 lít không khí/lít môi trường/phút; tỷ lệ giống cấy 10% giống cấp 1 so với thể tích môi trường. Thời gian nuôi giống 84 - 96 giờ là thích hợp nhất. Sử dụng giống nấm dịch thể để nuôi trồng sẽ rút ngắn được 12 ngày/chu kỳ.

Từ khóa: Nấm chân dài (*Clitocybe maxima*), lên men ngập chìm, nấm ăn, hệ sợi nấm.

Study on The Technological Condition for Submerged Fermenter Culture of *Clitocybe Maxima* Strain

ABSTRACT

Clitocybe maxima is an edible mushroom with light brown color. Its fruiting body grows out as a stick, and then differentiates into a cap. *Clitocybe maxima* is also called bamboo shoot or long stem mushroom. The fruiting body contains plenty of amino acids and beneficial minerals essential for the human health. The present study investigated growth of *C. maxima* strain under liquid fermentation conditions. The experiment results indicated that the *C. maxima* mycelium grew best on medium containing 2 g yeast extract + 2 g pepton + 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 15 g glucose + 1.5 mg thiamin + 1,000 ml distilled water. On this medium, *C. maxima* mycelium grew fast and mycelial dry weight attained 33.9 g/ 1,000 ml with highest number of mycelial pellet. Different oxygen supply significantly affected the morphology and mycelial biomass. The optimal concentration of oxygen is 0.75 liters/1 liter of medium/minute; the rate of original spawn of grade 1 for inoculation is 10% of the medium volume. The most suitable incubation time was 84-96 hours. The use of liquid spawn for mushroom cultivation can reduce cultivating cycle by 12 days.

Keywords: *Clitocybe maxima*, submerged fermenter culture, mycelium.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm chân dài (*Clitocybe maxima*) là loại nấm ăn ngon, có giá trị dinh dưỡng và dược liệu cao. Quả thể nấm chân dài có kích thước lớn, hình dạng đẹp, dễ bảo quản do những ưu điểm này mà nấm được nuôi trồng ngày càng nhiều.

Hiện nay nấm chân dài được nuôi trồng nhiều ở Trung Quốc, Thái Lan để cung cấp nấm ăn tươi và được sử dụng để chế biến thành thực phẩm chức năng và dược phẩm để phòng bệnh. Ở Việt Nam, đã có những nghiên cứu về nấm chân dài ở qui mô phòng thí nghiệm, một vài nơi nuôi trồng tự phát, nhỏ lẻ, mang tính thủ công

theo công nghệ truyền thống nên chưa phù hợp với thực tế. Các cơ sở nuôi trồng nấm ở nước ta đều đang áp dụng công nghệ nhân giống nấm chân dài ở dạng rắn nên còn tồn tại một số nhược điểm như: tỷ lệ giống nhiễm bệnh khá nhiều (trên 10%), thời gian nuôi giống kéo dài (25 - 30 ngày) cho một cấp giống, thời gian từ khi cấy giống vào cơ chất nuôi trồng đến khi thu hái nấm thương phẩm dài (50 - 55 ngày), dẫn đến giá thành giống nấm và nấm thương phẩm cao. Trong khi đó việc ứng dụng sản xuất giống nấm chân dài dịch thể có hiệu quả rõ rệt so với giống thể rắn như rút ngắn thời gian sinh trưởng chỉ còn 4 - 5 ngày cho một cấp giống, sinh lực giống khỏe, tỷ lệ nhiễm giảm, tiết kiệm chi phí, thích hợp cho sản xuất giống nấm và nuôi trồng nấm theo qui mô công nghiệp (Yan *et al.*, 2003).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống nấm chân dài (Bi) có nguồn gốc từ Trung Quốc.

Nguyên liệu sử dụng trong thí nghiệm: đường Glucose, cao nấm men, pepton, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, vitamin B1...

Các điều kiện, trang thiết bị sử dụng trong thí nghiệm: máy khuấy từ; máy nghiền mẫu Homogenizer vo5 - Đức; kính hiển vi OPITIKA soi sợi và chụp ảnh, kết nối với máy tính đã cài phần mềm chuyên dụng; màng lọc khí Midisart kích thước 0,02 μm ; bình Duran 5000 ml được thiết kế như một Bioreactor nhỏ theo công nghệ của Hàn Quốc; máy li tâm; cân phân tích....

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm nhân giống nấm chân dài

Trong các nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp nhân giống nấm dịch thể theo Yan Chang - wei (2003).

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần môi trường dịch thể tới sự sinh trưởng của giống nấm chân dài

Môi trường nuôi cấy giống cấp trung gian nấm chân dài có thành phần như sau:

CT1: 200 g khoai tây + 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 15 g glucose + 25 g bột ngô + 20 g cám gạo + 1,5 mg thiamin

CT2: 1 g cao nấm men + 1,5 g pepton + 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin

CT3: 2 g cao nấm men + 2 g pepton + 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin

CT4: 3 g cao nấm men + 2,5 g pepton + 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin

CT5: 4 g cao nấm men + 3 g pepton + 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin

Nước cất được bổ sung cho đủ 1.000 ml dịch vào mỗi công thức, pH của môi trường được hiệu chỉnh để đạt pH = 6. Các thí nghiệm nuôi giống nấm được tiến hành trong điều kiện như nhau.

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ sục khí đến sự sinh trưởng của giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể.

Nuôi giống nấm chân dài trong cùng môi trường dịch thể công thức 3, pH = 6; nhiệt độ nuôi $26 \pm 1^\circ\text{C}$, với các chế độ sục khí khác nhau:

Mức 1: 0,45 V/V/M

Mức 4: 0,75 V/V/M

Mức 2: 0,55 V/V/M

Mức 5: 0,85 V/V/M

Mức 3: 0,65 V/V/M

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của lượng giống cấy đến sự sinh trưởng của giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể.

Thí nghiệm tiến hành trên môi trường công thức 3, lượng giống cấy vào môi trường bao gồm các mức: 5%; 7%, 10%, 12%, 15% thể tích giống cấp 1 so với thể tích môi trường nuôi cấy.

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự sinh trưởng của giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể.

Thí nghiệm tiến hành trên môi trường công thức 3, theo dõi sự sinh trưởng và sinh khối sợi của giống trong từng giai đoạn: 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ, 84 giờ, 96 giờ, 120 giờ.

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của giống dịch thể đến sinh trưởng của nấm chân dài trên nguyên liệu nuôi trồng.

Sử dụng giống nấm chân dài dạng hạt và giống dịch thể cấy trên nguyên liệu nuôi trồng có thành phần: 39% bông hạt + 40% mùn cưa + 20% cám gạo + 1% CaCO_3

Giống nấm chân dài đối chứng là giống thể hạt đúng tuổi sử dụng (sợi nấm phủ kín bình nguyên liệu 3 ngày); Giống nấm chân dài dạng dịch thể gồm: Giống dịch thể 84 giờ tuổi và giống dịch thể 96 giờ tuổi.

2.2.2. Xác định số lượng, kích thước khuẩn lạc cầu

Trong quá trình nuôi giống nấm trong môi trường dịch thể, ban đầu hình thành các mảnh sợi nấm nhỏ li ti, sau đó sợi nấm lớn lên, liên kết lại với nhau tạo thành viên hình cầu có kích thước khác nhau, các thể hình cầu này được gọi là khuẩn lạc cầu (KLC).

Kết thúc quá trình nuôi, tiến hành kiểm tra, quan sát dịch, mật độ KLC, đo kích thước KLC trên kính hiển vi OPITIKA có kết nối với máy tính đã cài phần mềm đo kích thước và chụp ảnh, đồng thời giống dịch thể được ly tâm thu sinh khối sợi.

2.2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

- Mật độ sợi hình cầu (khuẩn lạc cầu) (KLC/ml)
- Mật độ sợi hình cầu được biểu thị:
 - (+) Biểu thị lượng KLC từ 10 - 30/ml dịch
 - (++) Biểu thị lượng KLC từ 31 - 60/ml dịch
 - (+++)
 - (++++)
 - (+++++) Biểu thị lượng KLC từ 91 - 120/ml dịch
 - (+++++) Biểu thị lượng KLC lớn hơn 120/ml dịch

- Sinh khối sợi (g/1.000 ml)
- Đường kính khuẩn lạc cầu (mm)
- Đặc điểm giống dịch thể
- Thời gian sợi mọc kín giá thể
- Thời gian ra quả thể, năng suất nấm tươi

2.2.4. Xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel và IRRISTAT

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng dịch thể tới sinh trưởng của giống nấm chân dài

Dinh dưỡng là nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến toàn bộ quá trình sinh trưởng của giống nấm. Alam *et al.* (2009) đã nghiên cứu nuôi cấy nhiều giống nấm trên nhiều môi trường dinh dưỡng khác nhau, kết quả của các tác giả chứng minh môi trường bao gồm pepton, glucose và nấm là môi trường tối ưu nhất để sợi nấm sinh trưởng.

Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành cấy giống nấm chân dài trên 5 công thức môi trường khác nhau. Công thức 1 (đối chứng) là công thức môi trường có thành phần dinh dưỡng đang được sử dụng nhân giống nấm chân dài phổ biến nhất (không bổ sung agar).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường dịch thể đến sự sinh trưởng của giống nấm chân dài

Công thức	Kích thước KLC (mm)	Mật độ KLC	Sinh khối sợi (g/1000ml)	Đặc điểm khuẩn lạc cầu (KLC)
CT1	1,93	+	19,4	Dịch trong, KLC có tua, mật độ thưa
CT2	1.82	+++	27,8	Dịch trong, KLC có tua, mật độ trung bình
CT3	1,78	+++++	33,9	Dịch trong, KLC có tua, mật độ dày đặc.
CT4	1.8	++++	26,1	Dịch trong, KLC có tua, mật độ dày
CT5	1,96	++	22,4	Dịch trong, KLC có tua, mật độ thưa
CV%	4,1		4,7	
LSD _{0,05}	0,1		2,1	



Hình 1. Giống nấm chân dài sau 72 giờ tuổi nuôi trong các công thức môi trường khác nhau trên máy lắc



Hình 2. Hệ sợi nấm chân dài 72 giờ tuổi nuôi trong bình sục khí 5 lít (công thức 3)

Kết quả thí nghiệm về sự sinh trưởng của hệ sợi nấm chân dài trong các môi trường dịch thể có thành phần dinh dưỡng bổ sung khác nhau được trình bày ở bảng 1. Số liệu cho thấy sau 24 giờ, tốc độ sinh trưởng hệ sợi nấm đều chậm trên tất cả các công thức, bước đầu chưa thấy có sự khác biệt về tốc độ sinh trưởng hệ sợi trên các công thức môi trường.

Sau 24 đến 84 giờ, quan sát bằng mắt thường thấy tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm tăng mạnh, mật độ KLC nhiều, có màu trắng trong. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm có sự khác biệt giữa các công thức. Tốc độ sinh trưởng hệ sợi nấm nhanh nhất ở công thức môi trường 3, tiếp đến là công thức môi trường 2 và công thức môi trường 5; trên công thức môi trường 1 hệ sợi nấm sinh trưởng chậm. Dịch giống nuôi sau 84 giờ có mật độ sợi dày đặc, sau thời điểm này bằng mắt thường rất khó quan sát sự khác biệt về tốc độ sinh trưởng giữa các công thức.

Trên công thức môi trường nhân giống khác nhau, tốc độ sinh trưởng của sợi là khác nhau. Tốc độ sinh trưởng của sợi nấm tốt nhất trên công thức 3 (CT3: 2 g cao nấm men + 2 g pepton + 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin)

3.2. Ảnh hưởng của chế độ sục khí tới sinh trưởng của giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể

Lượng oxy hòa tan nhất định trong dịch lỏng nuôi giống nấm là điều kiện không thể

thiếu trong quá trình nuôi giống. Trong quá trình lên men, nấm lớn không ngừng tiêu thụ oxy và dinh dưỡng, khiến nồng độ oxy hòa tan luôn có xu hướng giảm xuống, chế độ sục khí phù hợp có thể thúc đẩy hòa tan oxy, nâng cao mức độ tiếp xúc với oxy, dinh dưỡng của sợi nấm. Mỗi loại nấm có tốc độ sinh trưởng khác nhau dẫn đến khả năng tiêu thụ oxy và dinh dưỡng khác nhau. Tuy nhiên nếu chế độ sục khí quá lớn sẽ gây tác động cơ học lớn từ môi trường vào hệ sợi nấm gây bất lợi cho sự sinh trưởng của hệ sợi.

Ở thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ sục khí tới sự sinh trưởng của hệ sợi nấm chân dài, chúng tôi sử dụng môi trường 3 là những môi trường có triển vọng, chuẩn pH ở 6,5 để tiến hành khảo sát chế độ sục khí tối ưu để nuôi giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể.

Theo nghiên cứu của một số các tác giả, sự thay đổi về tốc độ sục khí sẽ dẫn tới sự thay đổi hình thái hệ sợi từ dạng hệ sợi nấm (filamentous) sang các KLC (pellets) và ngược lại (Park, 2001); trong đó KLC được đặc trưng bởi hệ sợi nấm phát triển mạnh, phân nhánh, đan xen bện chặt vào với nhau (Wang, 2005).

Giống nấm chân dài được lên men chìm trong môi trường nhân giống, cung cấp oxy bằng máy bơm sục khí có màng lọc midisart 0,02 μm . Lưu lượng cấp khí bơm vào trong môi trường ở các mức khác nhau: 0,45; 0,55; 0,65; 0,75; 0,85 lít không khí/lít môi trường/phút (V/V/M). Kết quả thí nghiệm được ghi nhận ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của cường độ sục khí đến sinh trưởng của giống nấm chân dài

Mức độ cấp khí (V/V/M)	Kích thước KLC (mm/KLC)	Mật độ KLC	SK sợi (g/1.000 ml)
0,45	1,62	+	20,7
0,55	1,47	++	28,9
0,65	1,02	++++	29,8
0,75	0,81	++++	31,6
0,85	0,54	+++++	28,8
CV %	3,4		3,5
<i>LSD</i> _{0,05}	0,7		1,8

**Hình 3. Giống nấm chân dài cấp trung gian nuôi ở các chế độ cấp khí khác nhau**

Mức độ cấp khí ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng của sợi nấm, thông thường thì trong giới hạn cho phép, chế độ cấp khí càng cao thì mật độ KLC (khuẩn lạc cầu) càng nhiều, sinh khối sợi càng tăng. Tuy nhiên nếu chế độ khí quá mạnh thì sinh khối sợi lại giảm, do tốc độ cao tạo ra lực cắt lớn làm giảm sự tăng trưởng của sợi nấm. Sinh khối sợi nấm chân dài tăng khi mức cấp khí tăng từ 0,45 - 0,75 V/V/M, nhưng vượt quá cường độ sục 0,75 V/V/M sinh khối sợi giảm, sinh khối sợi đạt 31,6 g/1.000 ml dịch giống khi cấp khí ở mức 0,75 V/V/M và giảm xuống còn 28,8 g/1.000 ml dịch giống khi cấp khí ở mức 0,85 V/V/M.

Các tác giả nghiên cứu nuôi cấy giống nấm trong bioreactor, kết quả chỉ ra rằng thay đổi cường độ sục khí thì tỷ lệ tăng trưởng và kích thước KLC thay đổi, quan sát thấy tăng mức cấp khí thì kích thước viên nhỏ hơn dẫn đến tốc

độ tăng trưởng cao hơn. Để thúc đẩy tăng trưởng sợi nấm thì giống cần được phá vỡ dạng viên mịn, nhưng mặt khác, sự cân bằng giữa tăng trưởng và phân đoạn sợi nấm cũng phải phù hợp nếu không sẽ ức chế sinh trưởng của hệ sợi (Marquez *et al.*, 1999).

3.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy tới sinh trưởng của giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể

Tỷ lệ giống gốc cấy vào môi trường dịch thể luôn là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của giống, tới mật độ và kích thước của KLC. Trong nghiên cứu giống trung gian của nấm chân dài tỷ lệ giống cấy được tính theo tỷ lệ với môi trường nuôi cấy. Các mức độ giống cấy cho môi trường bao gồm: 5%; 7%, 10%, 12%, 15% giống cấp 1 so với môi trường nuôi cấy. Kết quả ở bảng 3 cho thấy giống

Bảng 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ giống cấy đến sinh trưởng phát triển của giống nấm chân dài trong môi trường dịch thể

Tỷ lệ giống (%)	Kích thước KLC (mm)	Mật độ KLC	SK sợi (g/1.000 ml)
5	1,78	+	20,6
7	1,41	++	22,5
10	1,08	++++	32,8
12	0,86	++++	28,4
15	0,52	+++++	28,4
CV %	4,6		2,9
LSD _{0,05}	0,93		1,4

nấm chân dài khi cấy với tỷ lệ giống thấp (5% giống so với môi trường) cho mật độ KLC thấp, sinh khối sợi rất thấp, kết thúc quá trình nuôi cấy nấm chân dài đạt 20,6 g/1.000 ml.

Đối với giống nấm chân dài cấp trung gian, cấy mật độ 10% giống cho sinh khối sợi cao nhất (28,6 g/1.000 ml), KLC đồng đều, dịch không bị kết vón. Khi tăng lượng giống cấy của cả hai giống đến 12% thì dịch nuôi cấy có xu hướng chuyển dạng huyền phù, khí lưu thông khó khăn, các KLC có kích thước nhỏ, thường kết vón với nhau, sinh khối sợi không tăng mà có xu hướng giảm.

Sự lưu thông dòng chảy của môi trường lỏng bị ảnh hưởng mạnh bởi sinh khối sợi nấm (Hwang *et al.*, 2004), khi cấy mật độ quá lớn dẫn đến sự gia tăng lớn về độ nhớt của môi trường trong quá trình lên men, gây ra khó khăn cho việc hấp thụ dinh dưỡng và trao đổi oxy. Đối với các trạng thái hình dạng sợi nấm tồn tại trong môi trường nuôi cấy, trong đó nấm

phát triển như dạng viên có xu hướng ít nhớt hơn so với dạng phát triển dạng sợi phân tán (Gibbs *et al.*, 2000). Các nghiên cứu của các tác giả trước đều phù hợp với kết quả nghiên cứu này, khi cấy lượng giống quá lớn so với môi trường, dịch thường có dạng huyền phù cao, khó khăn cho sự lưu thông của dịch.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi tới sự sinh trưởng phát triển của hệ sợi nấm chân dài trong môi trường dịch thể

Chu kỳ sinh trưởng của giống nấm trải qua 4 giai đoạn: Giai đoạn tiềm tàng, giai đoạn tăng trưởng (pha tăng tốc: mật độ tế bào bắt đầu tăng; pha tăng trưởng cực đại; pha tăng trưởng chậm), giai đoạn ổn định và giai đoạn suy tàn. Giống dịch thể có tốc độ sinh trưởng rất nhanh, do đó việc xác định thời gian sợi nấm đạt đến giai đoạn hoạt lực khỏe nhất, sinh khối cao nhất rất quan trọng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến sự sinh trưởng của sợi nấm chân dài dịch thể

Thời gian (giờ)	Mật độ KLC	Sinh khối sợi (g/1.000 ml)	Đặc điểm KLC
48	+	21,2	Sợi phân tán, chưa bám thành chai
60	++	24,6	Sợi phân tán, viên sợi có tua, nhỏ, mật độ ít
72	++++	28,2	Sợi liên kết chặt, viên sợi có tua ngắn, mật độ dày, dịch dạng huyền phù
84	++++	31,6	Giống đặc sệt, nhiều KLC to.
96	++++	33,9	Sợi liên kết chặt, KLC to, nhẵn
120	++++	33,1	Sợi hình cầu có biểu hiện giảm liên kết, viên sợi biến dạng
CV %		3,6	
LSD _{0,05}		1,7	

Trong thí nghiệm này, định kỳ lấy giống nấm các giai đoạn tuổi giống khác nhau (48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 giờ) để quan sát. Kết quả cho thấy: trong 24 giờ đầu hệ sợi của cả hai giống nấm đều sinh trưởng rất chậm, trong 48 - 72 giờ đầu, quan sát bằng mắt thường thấy mật độ và kích thước KLC tăng mạnh.

Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy trong 48 giờ đầu sinh khối sợi nấm chân dài đã bắt đầu phát triển mạnh, sinh khối sợi tăng đạt cực đại ở 96 giờ (33,9 g/1.000 ml), sau đó giảm xuống 33,1 g/1.000 ml tại 120 giờ nuôi cấy.

Để có kết luận chính xác hơn, sau mỗi giai đoạn chúng tôi tiến hành kiểm tra hoạt lực của các KLC trong từng công thức thí nghiệm. Kết quả nhận thấy hệ sợi nấm chân dài trong thời gian 84 - 96 giờ có sức sống khỏe nhất, KLC có thời gian mọc sợi nhanh nhất.

3.5. Ảnh hưởng của giống dịch thể đến sinh trưởng của nấm chân dài trên nguyên liệu nuôi trồng

Với những nghiên cứu khác, mục đích chính là thu sinh khối sợi nên chỉ dừng lại ở việc theo dõi sinh khối sợi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, mục đích cuối cùng là thu quả thể nấm; do sinh khối sợi chưa hoàn toàn đánh giá được giống tốt hay xấu, nên bước tiếp theo trong nghiên cứu chúng tôi dùng giống thể rắn làm đối chứng, sử dụng giống nấm chân dài dạng dịch thể trong thí nghiệm 4, nuôi trong thời gian từ 84 - 96 giờ để nuôi trồng thử nghiệm.

Số liệu theo dõi sự sinh trưởng của hệ sợi và

hình thành quả thể nấm chân dài khi sử dụng giống nấm thể dịch và thể rắn để nuôi trồng ở bảng 5 cho thấy: Sau khi cấy chuyển giống dạng rắn và giống dịch thể nấm chân dài sang nguyên liệu nuôi trồng, trong 1 - 2 ngày đầu, giống ở dạng thể rắn sinh trưởng rất nhanh, giống nảy mầm trắng xóa bề mặt bịch nguyên liệu; trái lại trong 2 ngày đầu giống dịch thể nấm sinh trưởng chậm, sau ngày thứ 4 mới nhìn rõ sự nảy mầm của các KLC. Bắt đầu từ ngày thứ 8 - 9, nhìn rõ những đám sợi nấm sinh trưởng trên bề mặt bịch, xung quanh bịch và cả dưới đáy bịch. Lúc này các đám sợi chưa liên kết với nhau nên hệ sợi cấy từ giống dịch thể trông không dày và trắng như hệ sợi cấy từ giống dạng rắn; sang ngày thứ 15 - 16, nhìn thấy sự khác biệt hoàn toàn giữa việc sử dụng giống dạng rắn và giống dạng dịch thể.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy: sử dụng giống dịch thể giúp giảm bớt thời gian để sợi mọc kín nguyên liệu và thời gian ra quả thể sớm hơn, năng suất cao hơn so với giống thể rắn. Khi sử dụng nguồn giống thể rắn (giống theo công nghệ truyền thống) để nuôi trồng nấm chân dài thì thời gian hệ sợi sinh trưởng kín bịch nguyên liệu là 40 ± 2 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể là 46 ± 3 ngày, hiệu suất sinh học đạt 56,0%. Trong khi sử dụng nguồn giống dịch thể (giống theo công nghệ mới) để nuôi trồng nấm chân dài thì thời gian hệ sợi sinh trưởng kín bịch nguyên liệu giảm xuống còn 28 ± 2 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể là 34 ngày, rút ngắn hơn so với sử dụng giống thể rắn 12 ngày; hiệu suất sinh học đạt 61,6 - 62,8%.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn giống dịch thể đến sự sinh trưởng của nấm chân dài trên nguyên liệu nuôi trồng

Chỉ tiêu sinh trưởng	Tỷ lệ nhiễm bệnh (%)	Thời gian sợi sinh trưởng kín giá thể (ngày)	Thời gian xuất hiện quả thể (ngày)	Hiệu suất sinh học (%)
Giống thể rắn	12,1	40 ± 2	46 ± 3	56,0
Giống dịch thể	84 giờ	28 ± 2	34 ± 3	61,6
	96 giờ	28 ± 2	34 ± 3	62,8



Hình 4. Nuôi trồng nấm chân dài bằng giống dạng hạt



Hình 5. Nuôi trồng nấm chân dài bằng giống dịch thể

5. KẾT LUẬN

Qua các kết quả thí nghiệm trình bày ở trên, chúng tôi rút ra các kết luận sau:

- Giống nấm chân dài nuôi cấy trong môi trường dịch thể thích hợp nhất với công thức môi trường 3 (CT3: 2 g cao nấm men + 2 g pepton + 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 15 g glucose + 1,5 mg thiamin + 1.000 ml nước cất) thu được sinh khối sợi lớn nhất (33,9 g/1.000 ml dịch).

- Chế độ độ sục khí 0,75 lít không khí/lít môi trường/phút. Tỷ lệ giống cấy ở mức 10% giống cấp 1 so với thể tích môi trường cho sinh khối sợi cao nhất (31,6 g/1.000 ml dịch).

- Sinh khối sợi nấm chân dài tăng mạnh nhất từ 84 - 96 giờ, hoạt lực của KLC mạnh nhất từ 84 - 96 giờ.

- Sử dụng giống nấm dịch thể để nuôi trồng sẽ rút ngắn được 12 ngày/chu kỳ nuôi trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alam N., Shim M.J., Lee M.W., Shin P.G., Yoo Y.B and Lee T.S. (2009). "Vegetative growth and phylogenetic relationship of commercially cultivated strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS

sequence and RAPD", *Mycobiology*, 37(4): 258 - 266.

Gibbs P.A., Seviour R.J. and Schmid F. (2000). "Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions", *Crit. Rev. Biotechnol.*, 20: 17 - 48.

Hwang H. J., Kim S. W., Xu C. P., Choi J. W. and Yun J. W. (2004). "Morphological and theological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures", *J. Appl. Microbiol.*, 96(6): 1296 - 1305.

Marquez - Rocha F.J., Guillén G.K., Sánchez J.E. and Vázquez R.D. (1999). "Growth characteristic of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors", *Biotechnol. Tech.*, 13: 29 - 32.

Park (2001). "Optimization of submerged culture condition for mycelial growth and exo - biopolymer production by *Cordyceps militaris*" *Korean J Mycol.*, 30: 56 - 62.

Wang W., Zhu Z. and Li P. (2005). "Study on the technological conditions for submerged fermenter culture of eight strains of *Flammulina velutipes*", *Fifth International conference on mushroom biology and mushroom products*, 12: 318 - 322.

Yan Chang - wei, Chen he, Qin jun - zhe, Chen yi - ding (2003). *Studies on liquid inoculum filtration and cultivated condition of Flammulina velutipes*. Edible Fungi of China. College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xianyang, 71208.