

# TIẾN BỘ KỸ THUẬT

## QUY TRÌNH SẢN XUẤT NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris*) TRÊN MÔI TRƯỜNG KHOÁNG CHẤT THỰC VẬT

### PHẦN I. THÔNG TIN CHUNG

**1.1. Tên tiến bộ kỹ thuật:** Quy trình sản xuất nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường khoáng chất thực vật.

#### 1.2. Tác giả

**1.2.1. Nhóm tác giả:** ThS. Nguyễn Phạm Trúc Phương, TS. Phạm Đình Dũng, ThS. Lê Văn Cửa, ThS. Nguyễn Thanh Hiền, ThS. Nguyễn Thị Loan, ThS. Hoàng Đức Hiệt, ThS. Phạm Việt Khải, CN. Nguyễn Thị Kim Khánh, ThS. Nguyễn Ánh Tuyết, KS. Trần Thị An, ThS. Lương Thị Ngọc Hân, KS. Đỗ Thị Như Thảo, CN. Nguyễn Trần Đức Duy, CN. Nguyễn Văn Lương, ThS. Lê Thành Hưng, ThS. Vũ Thị Thu Thảo, ThS. Phạm Cao Khải, ThS. Phạm Quang Thắng, ThS. Phạm Thị Thảo.

**1.2.2. Tổ chức có tiến bộ kỹ thuật được công nhận:** Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao - Ban quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh.

- Địa chỉ: Ấp 1, xã Nhuận Đức, Thành phố Hồ Chí Minh

- Điện thoại: 028.3537.5910

- Email: [nghiencuu.ahp@tphcm.gov.vn](mailto:nghiencuu.ahp@tphcm.gov.vn)

#### 1.3. Xuất xứ của tiến bộ kỹ thuật:

Tiến bộ kỹ thuật được xây dựng dựa trên cơ sở các kết quả nghiên cứu của các đề tài, nhiệm vụ khoa học và công nghệ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao trực thuộc Ban quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh, cụ thể:

- Nhiệm vụ khảo sát: “Khảo sát và phân tích thị trường về nhu cầu sử dụng đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường có nguồn dinh dưỡng và khoáng chất thực vật phù hợp cho người ăn chay”.

- Nhiệm vụ khoa học và công nghệ: “Nghiên cứu thử nghiệm nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên cơ chất thực vật”.

- Kế thừa quy trình tiến bộ kỹ thuật “Quy trình sản xuất nấm Nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường không sử dụng nhộng tằm” đã được công nhận theo Quyết định số 06/QĐ-TT-VPPN, ngày 05/01/2023 của Cục Trồng trọt - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- Nhiệm vụ xây dựng và cải tiến mô hình: Báo cáo so sánh giữa hai quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*), gồm: Quy trình 1 - Quy trình sản xuất nấm Đông trùng hạ thảo trên môi trường không sử dụng nhộng tằm nhưng vẫn dựa trên các nguồn dinh dưỡng tổng hợp có nguồn gốc từ động vật (lòng đỏ trứng, pepton thịt,...) và Quy trình 2 - Cải tiến quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo trên môi trường có nguồn dinh dưỡng và khoáng chất hoàn toàn từ thực vật, nhằm tạo sản phẩm thuần chay, an toàn, thân thiện môi trường và phù hợp người ăn chay.

- Nhiệm vụ xây dựng mô hình trình diễn: “Cải tiến quy trình nuôi trồng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường có nguồn dinh dưỡng và khoáng chất thực vật phù hợp cho người ăn chay”.

#### **1.4. Phạm vi ứng dụng**

Quy trình này được áp dụng trên phạm vi toàn quốc.

#### **1.5. Điều kiện ứng dụng**

Điều kiện áp dụng: Cơ sở nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo có phòng nuôi trồng được thiết kế và trang bị hệ thống kiểm soát môi trường phù hợp: nhiệt độ từ 19- 21°C; độ ẩm từ 90 - 95%; hệ thống chiếu sáng bằng đèn LED với cường độ ánh sáng 800 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày; nồng độ khí CO<sub>2</sub> <1000 ppm.

### **PHẦN II. NỘI DUNG TIỀN BỘ KỸ THUẬT**

#### **2.1. Giới thiệu về tiến bộ kỹ thuật**

Quy trình sản xuất nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường khoáng chất thực vật được xây dựng trên cơ sở kế thừa và chuẩn hóa một số thông số của “Quy trình sản xuất nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường không sử dụng nhộng tằm” đã được Cục Trồng trọt - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận theo Quyết định số 06/QĐ-TT-VPPN ngày 05/01/2023. Điểm đổi mới cốt lõi của quy trình này nằm ở việc thay thế hoàn toàn nguồn dinh dưỡng động vật (lòng đỏ trứng gà, pepton thịt) bằng các nguồn đạm và khoáng chất có nguồn gốc thực vật gồm bột đậu nành và dịch chiết rong phổ tai trong công thức môi trường nuôi trồng. Bên cạnh đó, quy trình còn chuẩn hóa nguồn nguyên liệu đầu vào, các thông số vi khí hậu theo từng giai đoạn sinh trưởng (ươm sợi và hình thành quả thể), đặc biệt là kiểm soát nồng độ CO<sub>2</sub>, độ ẩm và chế độ chiếu sáng, góp phần tối ưu hóa sự phát triển hình thái và tích lũy hoạt chất trong sinh khối quả thể.

#### **2.2. Nội dung Quy trình**

##### **2.2.1. Bước 1: Chuẩn bị cơ sở hạ tầng, thiết bị, dụng cụ**

##### **2.2.1.1. Chuẩn bị cơ sở hạ tầng**

###### *a) Phòng pha chế môi trường và khử trùng*

- Phòng pha chế môi trường dùng để vệ sinh, rửa, sấy các dụng cụ, xử lý, pha chế và khử trùng dụng cụ, môi trường nhân giống, môi trường nuôi trồng. Phòng phải đảm bảo các yêu cầu sau:

- + Phải được kiên cố, sạch sẽ.
- + Có diện tích tương đối rộng rãi, thông thoáng cho việc đi lại, thao tác trong khi làm việc;
- + Có hệ thống điện nước đầy đủ, an toàn; có đường thoát nước tốt.

###### *b) Phòng làm nguội, phòng cấy giống*

- Phòng làm nguội: Dùng chứa, bảo quản môi trường sau khi đã tiệt trùng, cần đảm bảo các yêu cầu sau:

- + Phòng làm nguội được bố trí thông với phòng môi trường và phòng cấy giống nhằm để thuận tiện di chuyển môi trường trước và sau khi cấy giống xong.

+ Kiên cố, sạch sẽ có thể thường xuyên vô trùng, khử khuẩn để giảm nguy cơ nhiễm khuẩn.

+ Được lắp đặt điều hòa để duy trì nhiệt độ từ 16-18°C, máy hút ẩm duy trì độ ẩm từ 65-70%; quạt gió để duy trì độ thông thoáng, nồng độ khí CO<sub>2</sub> dưới 2000 ppm.

- Phòng cây giống nấm: Dùng để nhân giống và cấy chuyển giống nấm các cấp. Phòng cây giống thường đặt trong Phòng làm nguội, phòng cần được thiết kế theo tiêu chuẩn phòng sạch (tốt nhất là được thiết kế theo tiêu chuẩn ISO 14644: 2015- Tiêu chuẩn thiết kế, xây dựng, vận hành và kiểm soát chất lượng của phòng sạch), đảm bảo các yêu cầu sau:

+ Sạch sẽ, thường xuyên vô trùng để giảm thiểu nguy cơ nhiễm bệnh và ô nhiễm từ bên ngoài;

+ Thông thường sẽ thông với Phòng làm nguội và phòng nuôi giống.

+ Có thể lắp đặt hệ thống kính và ốp gạch men xung quanh tường để đảm bảo vệ sinh dễ dàng.

+ Được lắp đặt máy điều hòa 2 chiều để duy trì nhiệt độ từ 20-25°C máy hút ẩm duy trì độ ẩm 65-70%; quạt gió để duy trì độ thông thoáng khí trong phòng; nồng độ khí CO<sub>2</sub> dưới 2000 ppm; máy lọc không khí (nếu có).

+ Có hệ thống đèn UV để khử khuẩn thường xuyên cho tủ cấy, phòng cấy.

+ Có hệ thống đảm bảo an toàn đối với nhân viên và thiết bị trong phòng cấy như: Bình cứu hỏa, bảo hộ lao động, mặt nạ...

+ Thiết bị, hệ thống hỗ trợ trong phòng cấy cần được vận hành đúng cách và đúng quy trình để đảm bảo an toàn lao động, năng suất lao động và chất lượng giống nấm.

#### *c) Phòng nuôi giống*

- Phòng nuôi giống dùng cho việc nuôi sợi nấm, cần đảm bảo các yếu tố sau:

+ Sạch sẽ, thường xuyên vô trùng để giảm thiểu nguy cơ nhiễm bệnh và ô nhiễm từ bên ngoài.

+ Thông thường được bố trí liên thông với phòng cấy.

+ Được lắp đặt máy điều hòa 2 chiều để duy trì nhiệt độ từ 20-22°C, máy hút ẩm để duy trì độ ẩm từ 65-70%; quạt thông gió để điều tiết độ thông thoáng khí trong phòng, nồng độ khí CO<sub>2</sub> dưới 2000 ppm.

+ Trong phòng có thể bố trí các kệ giàn để xếp giống.

#### *d) Phòng bảo quản và lưu giữ giống*

- Sạch sẽ, thường xuyên vô trùng để giảm thiểu nguy cơ nhiễm bệnh và ô nhiễm từ bên ngoài;

- Được lắp đặt điều hòa 2 chiều để duy trì nhiệt độ trong phòng từ 20-25°C, quạt thông gió để điều tiết độ thông thoáng khí trong phòng.

- Tùy thời gian và yêu cầu bảo quản giống nấm mà trong phòng có thể bố trí thêm hệ thống tủ mát và tủ ấm.

*e) Phòng nuôi sợi nấm (phòng tối)*

- Phòng nuôi sợi dùng cho việc ương nuôi hộp giá thể trồng nấm đông trùng hạ thảo, phòng cần đảm bảo các yếu tố sau:

+ Sạch sẽ, thường xuyên vô trùng, để giảm thiểu nguy cơ nhiễm bệnh và ô nhiễm từ bên ngoài.

+ Thông thường được bố trí liên thông với phòng cấy giống.

+ Được lắp đặt máy điều hòa 2 chiều để duy trì nhiệt độ 20 - 22°C, máy hút ẩm để duy trì độ ẩm từ 65-70%; quạt thông gió để điều tiết độ thông thoáng khí trong phòng, nồng độ khí CO<sub>2</sub> dưới 2000 ppm.

+ Phòng được thiết kế là phòng tối hoàn toàn, tuy nhiên cần bố trí hệ thống chiếu sáng thuận tiện để phục vụ cho việc kiểm tra, theo dõi sự sinh trưởng của hệ sợi nấm và vệ sinh nhà xưởng.

+ Trong phòng có thể bố trí các kệ giàn để xếp hộp giá thể sau khi cấy giống.

*f) Phòng nuôi trồng quả thể nấm*

- Phòng nuôi trồng quả thể nấm đông trùng hạ thảo cần được thiết kế và trang bị các hệ thống máy móc đảm bảo các yêu cầu sau:

+ Phòng phải được xây dựng kiên cố. Khi thiết kế phòng nuôi quả thể nấm đông trùng hạ thảo cần lưu ý đến thiết kế vách và trần nhà, nên sử dụng các loại vật liệu có khả năng cách nhiệt để giúp bảo toàn nhiệt độ, cũng như để tránh sự thất thoát nhiệt ra môi trường, làm tiêu tốn điện năng. Hệ thống tường, trần nhà nên dùng sơn chống ẩm hoặc ốp gạch men xung quanh tường.

+ Phòng phải được lắp đặt hệ thống máy lạnh công nghiệp, hệ thống phun sương tạo ẩm, hệ thống đèn LED chiếu sáng, hệ thống quạt thông gió, hệ thống giàn giá để xếp hộp giá thể trồng nấm,...

+ Máy lạnh công nghiệp: Lựa chọn loại máy lạnh công nghiệp có công suất phù hợp với diện tích của phòng nuôi. Yêu cầu nhiệt độ trong phòng duy trì từ 18-20°C trong suốt quá trình chăm sóc quả thể nấm đông trùng hạ thảo.

+ Hệ thống chiếu sáng bằng đèn LED: Lựa chọn loại bóng đèn chiếu sáng phù hợp với phòng nuôi, nên sử dụng loại ánh sáng trắng của bóng đèn LED. Tùy thuộc vào kích thước giàn giá mà bố trí bóng đèn cho hợp lý, đảm bảo đủ ánh sáng cung cấp cho mỗi tầng giàn từ 800 - 1000 lux.

+ Hệ thống phun sương tạo ẩm: Lựa chọn máy tạo ẩm dạng phun sương có công suất phù hợp với diện tích của phòng nuôi. Có thể tắt mở thủ công hoặc dùng hệ thống cảm biến, khi độ ẩm xuống dưới độ ẩm cho phép thì máy phun ẩm sẽ tự động hoạt động và tự động dừng hoạt động khi độ ẩm được đảm bảo. Việc này giúp duy trì độ ẩm trong phòng luôn ở mức phù hợp, không quá cao hoặc quá thấp. Yêu cầu độ ẩm không khí của phòng trên 90% trong suốt quá trình chăm sóc quả thể nấm đông trùng hạ thảo.

+ Giàn giá trồng nấm: Chất liệu inox hoặc sắt có sơn tĩnh điện hoặc sắt mạ kẽm. Mặt giàn để giá thể thiết kế lưới hoặc tấm aluminium. Chiều cao của giàn tùy thuộc vào chiều cao của phòng, thường gồm 4 - 6 tầng giàn, khoảng cách giữa các tầng giàn 40 cm; giàn cách mặt sàn từ 20 - 30 cm. Chiều rộng: Giàn đơn 60 cm, giàn kép từ 1,0 - 1,2 m.

+ Hệ thống quạt thông gió: Lựa chọn và lắp đặt quạt thông gió phù hợp với diện tích phòng nuôi trồng quả thể, đảm bảo độ thông thoáng khí trong phòng, nồng độ khí CO<sub>2</sub> dưới 1000 ppm trong suốt quá trình chăm sóc nấm đông trùng hạ thảo.

- Kết thúc mỗi vụ sản xuất, tiến hành vệ sinh và khử trùng toàn bộ thiết bị, không gian phòng nuôi trồng quả thể nấm bằng dung dịch khử trùng (Chloramin B, Formaldehyde, cồn,...) trước khi đưa vào vận hành cho vụ sản xuất mới.

#### *g) Khu vực thu hái, sơ chế sản phẩm*

- Đảm bảo vệ sinh, đảm bảo sản phẩm thu hái và sơ chế không bị nhiễm bệnh, nấm mốc.

- Dụng cụ, trang thiết bị dùng để thu hái phải đảm bảo vệ sinh, có thể dùng các chất liệu dễ vệ sinh, không bị hoen gỉ ... như inox, sắt sơn tĩnh điện.

- Đảm bảo các yếu tố nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng. Trong đó nhiệt độ, độ ẩm để đảm bảo sản phẩm được thu hái ở điều kiện tốt nhất, ánh sáng đảm bảo cho quá trình thao tác, sơ chế thuận tiện nhất.

#### *h) Phòng bảo quản sản phẩm*

- Phòng bảo quản sản phẩm phải đảm bảo vệ sinh sạch sẽ. Đảm bảo 2 yếu tố nhiệt độ và độ ẩm để đảm bảo quá trình bảo quản lý tưởng, ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn và không làm ảnh hưởng tới chất lượng của sợi nấm.

- Có lắp đặt hệ thống quạt gió, máy điều hòa nhiệt độ, máy hút ẩm để đảm bảo nhiệt độ, độ ẩm, không khí phù hợp.

Ngoài ra, cần lưu ý đến khu vực chứa hóa chất, nguyên liệu, vật tư đảm bảo sạch sẽ, khô ráo, thoáng mát, nhiệt độ đảm bảo chất lượng hóa chất, nguyên liệu đầu vào.

### **2.2.1.2. Chuẩn bị dụng cụ, thiết bị**

Các dụng cụ, trang thiết bị cần thiết cho sản xuất giống và nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo gồm có:

- Nồi hấp tiệt trùng: Khoảng nhiệt độ làm việc tối đa 150°C; Áp suất làm việc tối đa 2,5 atm; Các tính năng an toàn phải đảm bảo cho người sử dụng và môi trường xung quanh theo quy định của Việt Nam về thiết bị áp lực (theo Thông tư số 36/2019/TT-BLĐTBXH; QCVN 01:2008/BLĐTBXH).

- Tủ cấy an toàn sinh học: cấp II, sử dụng màng lọc HEPA, hệ thống đèn UV, hệ thống đèn chiếu sáng, hệ thống quạt gió đảm bảo môi trường vô trùng tuyệt đối, ngăn nhiễm chéo (Theo tiêu chuẩn EN 12469:2000).

- Cân phân tích 4 số: khả năng cân nhỏ nhất 0,0001g; sai số tối thiểu 0,1mg.

- Tủ ẩm: dải nhiệt độ hoạt động từ 5 - 60°C. Tủ có thể kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng,...

- Tủ sinh thái: dải nhiệt độ hoạt động từ -20°C đến +80°C, dải độ ẩm từ 30 - 98%, dải nồng độ CO<sub>2</sub> từ 0 - 20%.

- Tủ mát: dải nhiệt độ từ 0 - 15°C.

- Kính hiển vi: độ phóng đại: 40 - 100 lần, được sử dụng để quan sát, đánh giá chất lượng hệ sợi nấm; kiểm tra khả năng nhiễm khuẩn của giống nấm trong quá trình sản xuất giống.

- Máy lắc giống: kiểu lắc tròn, tốc độ lắc 0 - 360 vòng/phút, kích thước bình lắc 100-500ml, nguồn điện sử dụng 220V.
- Máy khuấy từ: tốc độ khuấy từ 100 - 1500 vòng/phút.
- Máy đo pH: dùng để đo độ pH của môi trường nhân giống.
- Máy đo độ ẩm: dùng để đo độ ẩm không khí trong quá trình sản xuất.
- Máy đo cường độ ánh sáng: dùng để đo cường độ ánh sáng của phòng nuôi sợi, phòng nuôi trồng quả thể nấm.
- Máy đo nồng độ khí CO<sub>2</sub>: dùng để đo nồng độ khí CO<sub>2</sub> của phòng nuôi sợi, phòng nuôi trồng quả thể nấm.
- Máy hút ẩm: dùng để điều tiết độ ẩm không khí trong phòng cấy giống, phòng nuôi sợi,... Tùy thuộc vào diện tích của phòng để lựa chọn máy hút ẩm có công suất phù hợp với mục đích sử dụng.
- Giàn giá: chất liệu inox hoặc sắt có sơn tĩnh điện hoặc sắt mạ kẽm. Mặt giàn thiết kế lưới hoặc tấm aluminium. Chiều cao của giàn tùy thuộc vào chiều cao của phòng, thường gồm 4 - 6 tầng giàn, khoảng cách giữa các tầng giàn 40 cm; giàn cách mặt sàn từ 20 - 30 cm. Chiều rộng: Giàn đơn 60 cm, giàn kép từ 1,0 - 1,2 m.
- Máy lạnh công nghiệp: Công suất tùy thuộc vào diện tích phòng nuôi, đảm bảo yếu tố nhiệt độ được cài đặt theo nhu cầu sử dụng
- Máy tạo ẩm phun sương: công suất phù thuộc vào diện tích phòng nuôi trồng quả thể.
- Hệ thống chiếu sáng bằng đèn LED: Công suất 800 - 1.000 lux.
- Máy sấy thăng hoa: lựa chọn tùy thuộc theo nhu cầu sản xuất của mỗi cơ sở.
- Máy sấy nhiệt: Dùng để sấy phần đế sau khi thu hái, hoặc chai lọ, dụng cụ ... Công suất phù thuộc vào nhu cầu sản xuất của mỗi cơ sở.
- Dụng cụ: Gồm nồi inox nấu môi trường, bếp đun, ca đồng hoặc ống đồng có thang chia thể tích, phễu thủy tinh, ống nghiệm kích thước 200 x 20 mm, đĩa petri đường kính 90 x 15 mm, giấy quỳ, rổ nhựa, khăn lọc, đĩa khay, khay inox, dao cấy, que cấy, kéo, pank, đèn cồn, máy say sinh tố, bộ dụng cụ cấy giống (kim cấy giống), máy cấy giống định lượng (nếu có), bình tam giác 500 ml, chai thủy tinh 500ml, bình Duran 2l/5l, màng lọc không khí, hộp nhựa PP dung tích 600 - 700 ml,...

### **2.2.2. Bước 2: Chuẩn bị vật tư, hóa chất thí nghiệm**

- Khoai tây: Không thối hỏng, đạt các chỉ tiêu an toàn thực phẩm ( dư lượng kim loại nặng, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật).
- Rong phôi tai: Đạt các chỉ tiêu an toàn thực phẩm ( dư lượng kim loại nặng, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, giới hạn độc tố vi nấm).
- Bột đậu nành: Đạt các chỉ tiêu an toàn thực phẩm ( dư lượng kim loại nặng, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, giới hạn độc tố vi nấm); có hàm lượng nitơ đạt  $\geq 5,71\%$ , không biến đổi gen.
- Glucose: Dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, độ tinh khiết trên 95%.
- Peptone: Dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, độ tinh khiết trên 95%.

- $\text{CaCl}_2$ : Dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, độ tinh khiết trên 95%.
- Acid folic: Dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, độ tinh khiết trên 95%.
- Cao nấm men: Dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, độ tinh khiết trên 95%.
- Gạo lứt: Gạo nâu, độ ẩm  $\leq 20\%$ , đạt các chỉ tiêu an toàn thực phẩm (dư lượng kim loại nặng, dư lượng thuốc bảo vệ thực vật, giới hạn độc tố vi nấm), không lẫn tạp.
- Agar: Dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, thành phần 100% rong câu.
- Cồn y tế 70°, cồn y tế 96°, NaOH 1M, HCl 1M.

### 2.2.3. Bước 3: Tạo nguồn giống (*Quy trình nhân giống cấp I; nhân giống cấp II*)

- Giống gốc là giống được phân lập trực tiếp từ quả thể nấm, bào tử của nấm hoặc sợi nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*.

- Giống cấp I (meo thạch) là nguồn giống được tạo ra bằng cách cấy chuyển tơ nấm từ giống gốc sang môi trường thạch dinh dưỡng (thường là potato dextrose agar) trong điều kiện vô trùng. Giống cấp I có độ thuần cao, không nhiễm tạp, sinh trưởng ổn định và được sử dụng để tiếp tục nhân giống sang cấp II.

- Giống cấp II (dạng dịch thể) là giai đoạn giống trung gian được nhân từ giống cấp I trên môi trường dinh dưỡng thích hợp (môi trường dịch thể) nhằm gia tăng nhanh sinh khối tơ nấm. Giống cấp II phải bảo đảm mật độ tơ cao, phát triển đồng đều, không nhiễm vi sinh vật tạp và được sử dụng trực tiếp để cấy vào cơ chất nuôi trồng quả thể trong sản xuất.

#### a) Chuẩn bị môi trường nhân giống

- Môi trường nhân giống cấp I (meo thạch): môi trường PDA (potato dextrose agar): khoai tây 200 g/L, dextrose 20 g/L, agar 20 g/L<sup>1</sup>.

- Cách pha môi trường PDA: khoai tây rửa sạch, gọt vỏ, cắt lát mỏng. Nấu 200 g khoai tây đã cắt lát mỏng trong 1000 mL nước cất 1 lần, giữ sôi trong khoảng 5 - 10 phút. Lọc thu dịch chiết, loại bỏ cặn. Hòa tan 20 g dextrose vào dịch chiết, thêm nước cất vừa đủ 1000 mL. Bổ sung thêm 20 g agar, làm nóng môi trường để làm tan agar hoàn toàn, thu được môi trường PDA. Chia môi trường vào chai thủy tinh (chiều cao 181 mm, đường kính cổ 86 mm) hoặc bình tam giác (đường kính đáy 105 mm; đường kính cổ 50 mm; chiều cao 175 mm). Thể tích môi trường bằng 2/3 thể tích bình chứa. Hấp khử trùng môi trường ở nhiệt độ 121°C trong 60 phút. Môi trường PDA sau khi lấy ra khỏi nồi hấp khử trùng được đưa vào tủ cấy, tiến hành đổ môi trường vào đĩa petri, quá trình đổ môi trường vào đĩa petri thực hiện trong điều kiện vô trùng.

- Môi trường nhân giống cấp II (dạng dịch thể): Môi trường SD<sub>1/2</sub> (Dextrose 20 g/L; peptone 5 g/L, cao nấm men 5 g/L)<sup>1</sup>

- Cách pha môi trường SD<sub>1/2</sub> lỏng: Để pha chế 1 lít môi trường SD<sub>1/2</sub>, cân chính xác 20 g glucose, 5 g peptone, 5 g cao nấm men, sau đó hòa tan trong 1000 mL nước cất và điều chỉnh pH về 5,5 - 6,0 bằng HCl hoặc NaOH 0,1 M nếu cần. Môi trường sau đó được chia vào chai thủy tinh đuran chịu nhiệt, tiệt trùng ở 121°C trong 60 phút rồi để nguội. Kiểm tra môi trường sau 24 - 48 giờ ở 25-28°C để đảm bảo không nhiễm khuẩn, và bảo quản ở 4°C.

<sup>1</sup> Kế thừa từ tiến bộ kỹ thuật theo Quyết định số 06/QĐ-TT-VPPN ngày 05/01/2023.

*b) Nhân giống nấm đông trùng hạ thảo*

- *Giống cấp I (meo thạch)*: Ống giống gốc được cấy chuyển vào môi trường đĩa thạch để tạo meo thạch; Thao tác: Ống giống, môi trường thạch đĩa chuẩn bị, các dụng cụ cấy đã tiệt trùng, ống nghiệm chứa cồn được đưa vào bên trong vùng thao tác của tủ an toàn sinh học. Dao cấy được tiệt trùng trước khi cấy bằng cách: cho dao vào ống nghiệm chứa cồn 70°, lấy ra và cho mũi dao vào gần ngọn lửa đèn cồn để dao bắt lửa, thao tác đốt dao được lặp lại ba lần (Lưu ý: không đốt dao trực tiếp trên ngọn lửa đèn cồn). Sau khi tiệt trùng dao bằng lửa của đèn cồn, đặt dao ở vùng vô trùng cho dao nguội nhưng vẫn giữ độ tiệt trùng. Sau khi dao nguội, dùng dao cắt một mảnh thạch chứa tơ nấm từ ống giống gốc và cấy vào đĩa môi trường thạch PDA sao cho phần thạch của giống gốc tiếp giáp với bề mặt môi trường thạch đĩa, phân tán mảnh tơ. Các đĩa thạch đã được cấy giống được nuôi ủ trong tủ ở nhiệt độ 22–25°C trong 10–15 ngày. Sau thời gian nuôi ủ khoảng 10 - 15 ngày giống cấp I phải đảm bảo các yêu cầu sau: Sợi nấm lan kín bề mặt môi trường một màu đồng nhất của sợi nấm, phân nhánh mạnh trên bề mặt môi trường. Không nhiễm vi sinh vật. Nhiệt độ nuôi ủ, tình trạng tạp nhiễm, hình thái tơ nấm, màu sắc tơ nấm của đĩa giống được theo dõi và kiểm tra hàng ngày.

- *Giống cấp II dạng dịch thể*: Đường kính khuẩn lạc của giống thạch đĩa đạt 2/3 đường kính đĩa thạch sẽ tiến hành cấy vào môi trường SD<sub>1/2</sub> lỏng để tạo giống lỏng; Thao tác: các thao tác vô trùng thực hiện tương tự thao tác cấy giống thạch. Dùng dao lấy các mảnh sinh khối nấm từ đĩa giống thạch cấy vào các bình môi trường SD<sub>1/2</sub> lỏng. Các bình giống lỏng đã cấy được nuôi ủ trong tối ở nhiệt độ 22- 25°C trong 5 - 7 ngày. Nhiệt độ nuôi ủ, tình trạng tạp nhiễm, hình thái tơ nấm, màu sắc tơ nấm, màu sắc môi trường, độ đục của đĩa giống được theo dõi và kiểm tra hàng ngày.

*c) Kiểm tra chất lượng giống nấm đông trùng hạ thảo*

- *Giống cấp I (meo thạch)*: Giống nấm đông trùng hạ thảo cần được kiểm tra định kỳ trong suốt thời gian nuôi sợi. Loại bỏ những đĩa giống bị nhiễm bệnh, những đĩa giống có hệ sợi phát triển bất thường, cụ thể như sau:

+ Loại bỏ những ống giống bị nhiễm nấm bệnh (nấm mốc xanh, nấm mốc đen, nấm mốc trắng...) và vi khuẩn với dấu hiệu nhận biết như sau: (1) Nhiễm nấm mốc đen, mốc xanh: Trên bề mặt môi trường nhân giống xuất hiện những vết bệnh có màu đen, màu xanh...; (2) Nhiễm khuẩn: Trên bề mặt môi trường thạch xuất hiện những vết bệnh màu trắng đục là khuẩn lạc của vi khuẩn.

+ Loại bỏ những đĩa giống có hệ sợi phát triển bất thường: Tốc độ phát triển hệ sợi chậm, hệ sợi phân bố không đều trên bề mặt môi trường nhân giống. Dấu hiệu nhận biết như sau: (1) Sợi nấm co lại không hoặc chậm phát triển, mật độ hệ sợi nấm mỏng, phân bố không đều; (2) Hệ sợi nấm xuất hiện chấm nước li ti có màu từ trắng chuyển sang vàng trong; (3) Hệ sợi nấm xuất hiện màu bất thường. Thông thường hệ sợi nấm đông trùng hạ thảo nuôi trong điều kiện không có ánh sáng sẽ có màu trắng, khi hệ sợi nấm đông trùng hạ thảo xuất hiện màu sắc lạ như nâu, xám tro, màu tối,... cần được loại bỏ lô giống.

- *Giống cấp II dạng dịch thể*: Giống nấm đông trùng hạ thảo cấp II dịch thể phải được kiểm tra định kỳ hàng ngày. Trong quá trình kiểm tra loại bỏ các bình dịch giống nhiễm nấm mốc (nấm mốc xanh, nấm mốc đen, nấm mốc trắng...), bình dịch bị nhiễm vi khuẩn, bình dịch có chất lượng hệ sợi không đạt tiêu chuẩn, cụ thể như sau:

+ Bình bị nhiễm nấm mốc (nấm mốc xanh, nấm mốc đen, nấm mốc trắng...): Quan sát trên thành bình dịch có xuất hiện các vết đốm màu xanh, hoặc đen. Khi dịch giống bị nhiễm nấm mốc xanh/đen thì quan sát thấy xuất hiện các khuẩn lạc cầu tròn, nhẵn, không có tua.

+ Bình dịch giống bị nhiễm vi khuẩn: Dịch giống bị đục, có mùi chua.

+ Bình dịch giống có hệ sợi nấm sinh trưởng chậm, khuẩn lạc cầu ít.

#### **2.2.4. Bước 4: Làm môi trường nuôi trồng**

*a) Thành phần môi trường bán rắn cải tiến nguồn đạm, nguồn khoáng từ thực vật*

- Gạo lứt 30 g/hộp, bột đậu nành 2,55 g/hộp.

- Dung dịch dinh dưỡng 60 ml (Thành phần: dịch chiết rong phổ tai 9,02 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l, axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ ).

*b) Cách chuẩn bị môi trường bán rắn*

- Chuẩn bị các hộp nhựa 720 ml, kích thước (Dài 110 x Rộng 10 x Cao 95 mm). Đong 30 g gạo lứt vào mỗi hộp.

- Cân 2,55 g bột đậu nành vào hộp nhựa đã cân gạo lứt.

- Chuẩn bị dịch chiết rong phổ tai: Rong phổ tai được cắt nhỏ thành từng đoạn 5-10 cm, cân rong phổ tai và đong nước cất 1 lần hoặc nước lọc RO theo tỷ lệ 9,02 g (rong phổ tai)/ 1 lít nước, sau đó đun sôi trong 30 phút, để nguội, thu lấy dịch chiết. Đối với acid folic cần pha dung dịch gốc trước khi pha môi trường. Pha dung dịch gốc acid folic có nồng độ 1000X. Cách pha dung dịch gốc acid folic: cân chính xác 0,005 g folic acid, hòa tan hoàn toàn vào 1000 ml. Dung dịch được trữ trong tủ mát.

- Pha môi trường dinh dưỡng: Cân chính xác 0,1 g  $\text{CaCl}_2$ , 1 ml pha dung dịch gốc acid folic, dịch chiết rong phổ tai vừa đủ 1000ml.

- Đong 60 ml dung dịch dinh dưỡng cho vào mỗi hộp nhựa, đậy miệng hộp bằng màng nylon PP và cố định bằng thun, tiệt trùng bằng nồi hấp tiệt ở nhiệt độ 121°C trong 60 phút, sau khi hấp xong thì để nguội ở nhiệt độ phòng qua đêm.

*c) Cấy giống*

- Trước khi cấy giống cần chuẩn bị:

+ Chuẩn bị phòng cấy giống và tủ cấy an toàn sinh học: Phòng cấy giống phải đảm bảo sạch sẽ, thông thoáng. Trước khi tiến hành cấy giống cần bật đèn UV 30 phút, sau đó tắt đèn UV và bật quạt gió 30 phút.

+ Chuẩn bị nhân lực: Ưu tiên 02 người/kíp cấy (1 người chính, 1 người phụ). Người trực tiếp cấy giống cần vệ sinh sạch sẽ, đầu tóc gọn gàng, mặc quần áo bảo hộ, sẵn sàng tay áo quá khuỷu tay, vệ sinh cánh tay và bàn tay bằng cồn 70°.

+ Chuẩn bị dụng cụ cấy giống: Gồm có đèn cồn, bình cồn, khay cấy và kim cấy giống được khử trùng bằng cồn 90°.

+ Trước khi cấy giống cấp I cần kiểm tra lại loại bỏ những đĩa giống bị nhiễm bệnh, những đĩa giống có hệ sợi phát triển bất thường.

+ Trước khi cấy giống cấp II dịch thể cần chuẩn bị: Kiểm tra thật kỹ bình giống cấp II dịch thể đúng chủng loại, có hệ sợi sinh trưởng khỏe, không nhiễm nấm bệnh,

đúng độ tuổi. Nên sử dụng giống cấp II dịch thể khoảng 4-7 ngày tuổi. Lau sạch bình giống cấp II dịch thể bằng cồn 70° trước khi đưa vào tủ cấy giống.

- Tiến hành cấy giống:

+ Đưa kim cấy giống qua lớp nilon chịu nhiệt và phun đều dịch giống lên bề mặt giá thể. Mỗi hộp giá thể được cấy 7-10 ml dịch giống. Khi cấy hết lượng giống ở 1 bình dịch giống cấp II cần tiến hành vệ sinh lại kim cấy bằng cồn 90° rồi mới chuyển sang bình dịch giống tiếp theo. Chú ý, thao tác cấy giống cần nhanh chóng, bình giống cấp II dịch thể và hộp giá thể giống luôn để gần ngọn lửa đèn cồn với khoảng cách an toàn từ 15-20 cm.

+ Sau khi cấy xong, các hộp giá thể được xếp vào rổ, ghi kí hiệu lô sản xuất, ngày tháng cấy giống và chuyển sang phòng nuôi sợi.

#### **2.2.5. Bước 5: Giai đoạn nuôi sợi**

- Các hộp giá thể trồng nấm đông trùng hạ thảo được chuyển sang phòng nuôi sợi và ươm nuôi ở điều kiện như sau:

+ Nhiệt độ: 20 - 22°C.

+ Độ ẩm: 65 - 70%

+ Ánh sáng: Tối hoàn toàn.

+ Nồng độ khí CO<sub>2</sub>: Dưới 2000 ppm.

- Thời gian nuôi sợi: 10 ngày.

#### **2.2.6. Bước 6: Xử lý hình thành quả thể và chăm sóc nấm**

- Sau khi kết thúc quá trình ươm sợi, tiếp tục tiến hành các bước sau:

+ Kết thúc quá trình ươm sợi, tiến hành cạo mặt loại bỏ lớp sợi bề mặt của hộp cơ chất và đưa hộp cơ chất vào phòng nuôi trồng quả thể.

- Điều kiện phòng nuôi trồng quả thể nấm đông trùng hạ thảo:

+ Nhiệt độ: 19- 21°C.

+ Độ ẩm: 90 - 95%.

+ Ánh sáng: Chiếu sáng bằng ánh sáng đèn LED với cường độ ánh sáng 800 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày.

+ Nồng độ khí CO<sub>2</sub>: Dưới 1000 ppm.

#### **2.2.7. Bước 7: Kiểm tra chất lượng hộp giá thể**

- Trong quá trình ươm sợi và chăm sóc quả thể, tiến hành kiểm tra các hộp giá thể nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo hàng ngày theo đúng quy trình kỹ thuật để loại bỏ những hộp giá thể không đảm bảo chất lượng và được tiến hành như sau:

- Loại bỏ hộp bị nhiễm khuẩn, nhiễm mốc (nấm mốc xanh, nấm mốc đen, nấm mốc trắng...). Dấu hiệu nhận biết như sau:

+ Nhiễm nấm mốc xanh/nấm mốc đen: Biểu hiện trong hộp nấm ở phần cơ chất hoặc cây nấm xuất hiện vết bệnh có màu xanh, xanh lục, đen.

+ Nhiễm nấm mốc trắng: Phần cơ chất xuất hiện hệ sợi màu trắng sau chuyển dần sang dạng bột.

+ Nhiễm vi khuẩn: Phần đáy cơ chất bị chua nát, hệ sợi nấm không sinh trưởng, phát triển kín hộp cơ chất được.

- Loại bỏ những hộp có hệ sợi nấm sinh trưởng chậm, có màu khác,... hoặc hộp có hệ sợi nấm không có khả năng chuyển màu khi đưa vào chiếu sáng.

#### **2.2.8. Bước 8: Thu hái và bảo quản**

- Khi quả thể nấm đông trùng hạ thảo phát triển dài khoảng từ 5-7 cm, phần đỉnh sinh trưởng quả thể nấm xuất hiện chấm màu trắng là thời điểm thu hái thích hợp.

- Trong quá trình thu hái nấm đông trùng hạ thảo cần tiến hành phân loại sản phẩm, loại bỏ các quả thể nấm có hình thái, màu sắc không đạt tiêu chuẩn.

- Quả thể nấm đông trùng hạ thảo tươi có thể được bảo quản trong thời gian 5 - 7 ngày ở điều kiện nhiệt độ 4°C. Hoặc sấy thăng hoa đạt độ ẩm dưới 2% và bảo quản trong điều kiện khô ráo, thoáng mát, không có ánh sáng.

## PHỤ LỤC

**Sơ đồ sản xuất nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường khoáng chất thực vật**

