PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NHÂN GIỐNG NẤM MỐI ĐEN (*Hymenopellis radicata*)

Nguyễn Ngọc Thạnh[1], Lê Huỳnh Trúc Vi[1], Đào Thị Yến Vy[1], Dương Thị Mỹ Duyên[1], Nguyễn Hoàng Quốc Tài[1], Lưu Minh Châu[1], Trần Minh Phúc[2], Trần Thị Giang[1,*], Huỳnh Xuân Phong[1]

[1] Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ

[2] Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ Kỹ thuật Vĩnh Long

[*]Email: ttgiang@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng nấm mối đen có khả năng thủy phân cellulose và tinh bột, đồng thời khảo sát môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của nấm ở giai đoạn nhân giống cấp 1 và cấp 2. Khả năng thủy phân cellulose và tinh bột được đánh giá trên môi trường CMC và tinh bột. Các chủng nấm sau khi đã phân lập và tuyển chọn được định danh dựa trên trình tự vùng ITS, kết quả cho thấy, cả hai chủng AG và TG đều thuộc loài *Hymenopellis radicata* (nấm mối đen với độ tương đồng 100%). Ở giai đoạn nhân giống cấp 1, sự phát triển của tơ nấm được theo dõi trên môi trường PGA bổ sung các thành phần khác nhau. Ở giai đoạn cấp 2, nấm được nuôi cấy trên các giá thể gồm: Hạt lúa, hạt bắp và hỗn hợp lúa, bắp có bổ sung $CaCO_3$. Kết quả cho thấy, hai chủng AG và TG có khả năng thủy phân cellulose và tinh bột tốt. Trên môi trường cấp 1, cả hai chủng được nuôi cấy trên môi trường thạch PGA bổ sung 20% nước dừa đều thể hiện chỉ tiêu sinh trưởng cao hơn so với các công thức khảo sát khác, với đường kính tơ của hai chủng AG và TG đạt lần lượt 8,83±0,06 cm và 8,07±0,32 cm. Ở giai đoạn cấp 2, các môi trường MTC2-2 và MTC2-3 được xem là phù hợp cho sự phát triển của hệ sợi, với chiều dài tơ đạt tối đa 8,50±0,24 cm sau 26 ngày nuôi cấy đối với chủng TG trên môi trường MTC1-2 và chủng AG đạt 8,50±0,17 cm trên môi trường MTC2-3.

Từ khóa: *Nấm ăn, nấm mối đen, nuôi trồng nấm, Hymenopellis radicata.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loài nấm *Hymenopellis radicata* (Relhan) R. H. Petersen còn được biết đến là *Xerula radicata* hoặc *Oudemansiella radicata*. Loài này cũng được gọi là nấm sợi dài hoặc nấm rễ sâu, hay được biết đến với tên thương mại là nấm mối đen. Đây là một loại nấm hoại sinh và thường được tìm thấy trong tự nhiên trên gỗ mục [1]. Bên cạnh lượng lớn protein, amino acid, lipid, chất béo, carbohydrate, vitamin và khoáng vi lượng, quả thể của nấm mối đen còn có tác dụng giúp hạ huyết áp. Các chiết xuất từ hệ sợi nấm cũng được nghiên cứu với khả năng chống các khối u trên chuột [2, 3]. Tại Việt Nam, nấm mối đen vẫn là đối tượng nghiên cứu tương đối mới, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào khảo sát đặc điểm sinh trưởng và tối ưu hóa điều kiện nuôi trồng. Kết quả cho thấy, cơ chất và bổ sung thành phần dinh dưỡng như cám gạo, bột bắp có ảnh hưởng đến tốc độ phát triển và năng suất nấm [1]. Nghiên cứu này không chỉ đánh giá khả năng sinh trưởng trên các nguồn cơ chất khác nhau mà còn sàng lọc ban đầu dựa trên khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào, cụ thể là cellulase và amylase, thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất. Các chỉ tiêu này là cơ sở lựa chọn chủng có tiềm năng để xây dựng quy trình nhân giống cho ứng dụng thực tiễn loài nấm này.

Cellulase và amylase là hai enzyme quan trọng trong quá trình thủy phân các hợp chất hữu cơ phức tạp như cellulose và tinh bột, chuyển hóa chúng thành các phân tử đơn giản hơn, thuận lợi cho sự hấp thu và sinh trưởng của nấm. Hiện nay, không chỉ nấm mối đen mà nhiều loài nấm khác cũng đang được nghiên cứu về nhu cầu dinh dưỡng và điều kiện môi trường tối ưu nhằm xây dựng quy trình canh tác hiệu quả và tiết kiệm chi phí. Các nghiên cứu gần đây đã tập trung phát triển mô hình nuôi trồng nấm theo hướng sạch và kiểm soát, bắt đầu từ môi trường cấp 1 trên đĩa thạch (agar) để phân lập và làm thuần giống, sau đó chuyển sang môi trường cấp 2 trên túi meo

nhằm nhân sinh khối và chuẩn bị cho giai đoạn sản xuất [4-6]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng thủy phân cellulose và tinh bột của các nguồn giống nấm mối đen trên môi trường đĩa thạch, tuyển chọn nguồn giống có khả năng thủy phân tốt, đồng thời bước đầu khảo sát điều kiện nuôi cấy cấp 1 và môi trường nhân giống cấp 2 làm cơ sở cho việc xây dựng quy trình nhân giống và nuôi trồng hiệu quả.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Giống nấm

Mười hai mẫu nấm mối đen được thu thập từ các cơ sở nuôi trồng nấm mối đen ở các tỉnh, thành thuộc khu vực Đồng bằng sông Cửu Long vào tháng 01 năm 2025. Mẫu nấm được thu hái dưới dạng quả thể và được bảo quản ở điều kiện tủ mát (2-4°C) tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ.

2.1.2. Vật liệu, hóa chất

Lúa IR50404, bắp hạt VN172, nước dừa, khoai tây được mua ở các chợ địa phương trên địa bàn phường Ninh Kiều (thành phố Cần Thơ). Riêng đối với công thức nước dừa, nguồn nguyên liệu được thu mua từ cùng một lô, sau khi lọc bỏ các tạp chất bằng màng lọc thông thường, nước dừa được chia thành các phần nhỏ trữ trong các tube 100 mL và bảo quản ở -20°C để sử dụng. D-Glucose, yeast extract, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $CaCO_3$, KI, I_2 và tinh bột từ Xilong Scientific (Trung Quốc), peptone của Himedia (Ấn Độ) và carboxymethyl cellulose (CMC) từ Công ty Sunrose (Nhật Bản).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng nấm mối đen tiềm năng

Mười hai mẫu quả thể nấm mối đen được thu thập và bảo quản trong túi khí vô trùng và trữ ở điều kiện tủ mát (4-6°C) không quá 3 ngày để phân lập nấm. Quả thể nấm mối đen được rửa sạch bề mặt bằng nước cất vô trùng, ngâm với cồn 70% trong 5 phút. Quả thể được làm khô tự nhiên, sau đó được xử lý bằng dung dịch Javel 0,1% trong 1 phút, lau khô bề mặt. Phần mô bên trong nơi gần mũ nấm được cắt bằng dao vô trùng và cấy lên môi trường thạch PGA (20% khoai tây, 2% glucose, 2% agar). Mẫu được nuôi cấy ở 24-26°C trong điều kiện tối và được kiểm tra mỗi ngày [7]. Sau 10-14 ngày, khi tơ nấm đã lan đều, dày, trắng sẽ được cấy truyền sang môi trường PGA để làm thuần giống. Giống thuần được trữ ở 4°C và cấy truyền mỗi tháng. Hệ sợi nấm được quan sát dưới kính hiển vi nhằm đánh giá đặc điểm vi thể của hệ sợi nấm.

- Đánh giá khả năng tổng hợp enzyme cellulase của các chủng nấm mối: Khả năng sản sinh enzyme cellulase được định tính thông qua đo đường kính vòng phân giải carboxymethyl cellulose (CMC). Đặt khoanh hệ tơ nấm (Φ 6 mm) của các chủng đã được làm thuần vào giữa môi trường thạch CMC (1% CMC, 0,4% peptone, 2% agar), sau 6 ngày nuôi cấy ở 24-26°C và phần tơ nấm lan trên bề mặt môi trường được loại bỏ. Sau đó, nhỏ dung dịch Lugol (I_2 1% và KI 2%) lên bề mặt thạch để quan sát và đo vòng thủy phân. Đường kính vùng thủy phân được xác định bằng khoảng cách giữa hai rìa đối diện của vòng phân giải, đi qua tâm khuẩn lạc. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp độc lập, mỗi lần lặp gồm một đĩa petri chứa một khuẩn lạc, các phép đo được thực hiện tại cùng thời điểm sau khi nuôi cấy trong cùng điều kiện thí nghiệm. Khả năng phân giải cơ chất của enzyme tỷ lệ thuận với đường kính vòng phân giải cơ chất (cm) [8].

- Đánh giá khả năng tổng hợp enzyme amylase của các chủng nấm mối: Tương tự, khả năng tổng hợp enzyme amylase của các chủng nấm mối được xác định bằng vòng thủy phân trên môi trường thạch tinh bột (1% tinh bột, 0,4% peptone, 2% agar) kết hợp với dung dịch Lugol. Đường kính vùng thủy phân được đo qua tâm khuẩn lạc và được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp độc lập. Đường kính của vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc được đo để đánh giá hiệu suất phân giải cơ chất (cm) [9]. Việc lựa chọn các chủng nấm mối đen tiềm năng không chỉ dựa trên chủng có hoạt tính cao nhất đối với từng loại enzyme riêng lẻ, mà được thực hiện dựa trên đánh giá đa tiêu chí, bao gồm khả năng tạo quầng thủy phân trên môi trường CMC và tinh bột.

- Định danh các dòng nấm mối đen được tuyển chọn bằng phương pháp giải trình tự: Dựa trên khả năng tạo vùng phân giải trên môi trường CMC và môi trường thạch tinh bột, các chủng nấm mối tiềm năng được giải trình tự vùng ITS bằng kỹ thuật PCR dựa trên cặp mồi ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') và ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Kết quả

giải trình tự được so sánh với trình tự nấm mốc trên ngân hàng dữ liệu của NCBI bằng công cụ Nucleotide BLAST.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm mối đen trên môi trường nhân giống

- Khảo sát môi trường nhân giống cấp 1: Chủng nấm mối có khả năng tạo quầng thủy phân tốt trên môi trường CMC và môi trường thạch tinh bột được chọn và khảo sát độc lập trên 4 môi trường nhân giống cấp 1 (MTC1-1, MTC1-2, MTC1-3 VÀ MTC1-4), trong đó công thức MTC1-1 (đối chứng) có thành phần dinh dưỡng đang được sử dụng nhân giống nấm. Thành phần môi trường MTC1-1 (PGA): 20% khoai tây, 2% glucose, 2% agar; MTC1-2: PGA + 20% nước dừa; MTC1-3: PGA + 0,2% yeast extract, 0,2% peptone; MTC1-4: PGA + 0,3% KH_2PO_4 + 0,15% $MgSO_4$. Chủng nấm mối đen tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường PGA và ủ ở 24-26°C trong tối. Sau 6 ngày nuôi cấy, chuyển khối thạch chứa hệ tơ nấm hệ tơ nấm (kích thước 1×2 cm) vào giữa đĩa môi trường nhân giống cấp 1 và ủ ở 24-26°C. Môi trường nhân giống cấp 1 được lựa chọn dựa vào tốc độ phát triển của hệ sợi (cm) và thời gian hệ sợi sinh trưởng kín bề mặt môi trường (ngày).

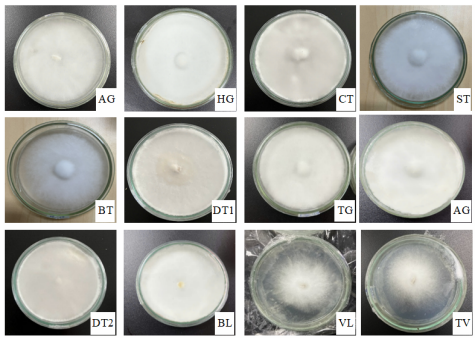
- Khảo sát môi trường nhân giống cấp 2 (meo nấm): Sự sinh trưởng và phát triển của nấm mối được đánh giá trên các loại giá thể gồm lúa và bắp hạt. Giá thể được xử lý trước khi cấy như sau: Lúa được ngâm trong nước 12-16 giờ, sau đó luộc đến khi vỏ trấu tách khoảng 1/3. Sau khi xử lý, lúa được để nguội đến 45-50°C và được điều chỉnh với mức ẩm 65-70%. Bắp hạt được ngâm trong nước ấm (40-45°C) trong 12-16 giờ, để ráo nước khoảng 30 phút trước khi phối trộn cũng được được kiểm tra để đạt mức ẩm tương đương. Ba môi trường nhân giống cấp 2 bao gồm: MTC2-1 (99% lúa + 1% $CaCO_3$), MTC2-2 (99% bắp hạt + 1% $CaCO_3$) và MTC2-3 (49,5% lúa + 49,5% bắp hạt + 1% $CaCO_3$). Các hỗn hợp được cho vào túi nilon chịu nhiệt kích thước 16x26 cm (350 g/túi), sau đó hấp khử trùng ở 121°C trong 2 giờ. Sau 6 ngày nuôi cấy trên môi trường nhân giống cấp 1, khối thạch chứa hệ sợi nấm được cắt bằng dao cấy vô trùng (kích thước 1×2 cm) và chuyển sang môi trường nhân giống cấp 2. Mẫu được ủ ở 24-26°C trong điều kiện tối và thoáng khí và được theo dõi định kỳ, các mẫu có dấu hiệu nhiễm không được sử dụng để đánh giá sinh trưởng. Tốc độ sinh trưởng của tơ nấm được xác định thông qua chiều dài trung bình của hệ sợi theo thời gian (cm/ngày). Các nghiệm thức được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại là 3 túi meo ở cùng một thời điểm và điều kiện môi trường thử nghiệm.

2.3. Phương pháp xử lí số liệu

Số liệu được thu thập và xử lí bằng phần mềm Microsoft Excel (Office 16.0, Microsoft Corp., Hoa Kỳ), các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại và kết quả phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Statgraphics Centurion 19 (Statgraphics Technologies, Inc., Hoa Kỳ). ANOVA một chiều tại mỗi thời điểm khảo sát và cho từng chủng và phép so sánh hậu nghiệm LSD được áp dụng khi kết quả ANOVA tổng thể có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$).

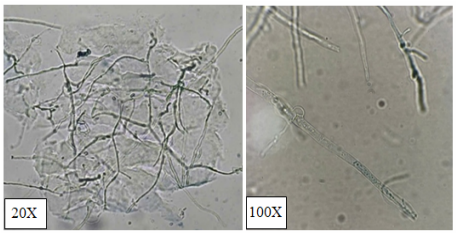
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập sơ bộ các chủng nấm mối đen



Hình 1. Hệ sợi nấm của 12 chủng nấm phân lập

Sau 11 ngày nuôi cấy, tất cả 12 chủng phân lập đều có mật độ hệ sợi dày đặc trên môi trường thạch PGA, phát triển dạng tỏa tròn đều, lan nhanh và có màu trắng đặc trưng của nấm mối (Hình 1), tương đồng với mô tả của Niego và cs (2021) [10].



Hình 2. Hình ảnh sợi nấm được quan sát dưới kính hiển vi, vật kính 20X và 100X

Kết quả quan sát vi thể hệ sợi nấm của các chủng hầu hết đều cho thấy những đặc điểm hình thái học tế bào điển hình của phân lớp

Agaricomycetes. Hệ sợi nấm có chỉ chứa một loại sợi duy nhất là sợi phát sinh được cấu tạo bởi các sợi nấm có vách ngăn rõ rệt, phân chia sợi nấm thành các tế bào riêng biệt mang tính biệt hóa cao (Hình 2). Đặc biệt, sự hiện diện phổ biến của cấu trúc khuyên nối tại vị trí các vách ngăn là minh chứng quan trọng khẳng định hệ sợi đang ở giai đoạn sợi nấm thứ cấp hữu tính. Cấu trúc này đóng vai trò cốt lõi trong việc điều hòa sự phân chia đồng bộ của cặp nhân, duy trì trạng thái song nhân ổn định để tích lũy sinh khối trước khi bước vào giai đoạn hình thành quả thể. Bên cạnh đó, thành tế bào sợi nấm có độ dày vừa phải và được củng cố bởi mạng lưới chitin bền vững. Thành phần polymer sinh học này không chỉ tạo độ bền cơ học giúp hệ sợi chống chịu được áp suất thẩm thấu khi xâm nhiễm sâu vào cơ chất gỗ mục, mà còn giữ vai trò như một rào cản bảo vệ hệ sợi trước các tác động bất lợi từ môi trường nuôi cấy. Những đặc điểm vi thể này hoàn toàn tương đồng với các mô tả phân loại học của phức hệ *Oudemansiella* hay *Xerula* trước đây [11].

3.2. Khả năng phân giải cellulose và phân giải tinh bột của các chủng nấm mối đen

Sau 6 ngày ủ, các chủng được nhuộm bằng dung dịch iod, sự hình thành vòng halo xung quanh khuẩn lạc ban đầu cho thấy hoạt động thủy phân của sinh vật [12]. Khả năng thủy phân cellulose của 12 chủng được định tính và đánh giá dựa vào đường kính halo trên môi trường rắn chứa carboxymethyl cellulos thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Đường kính thủy phân cellulose và tinh bột của 12 chủng

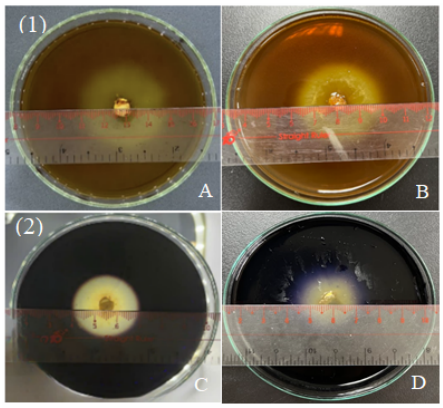
Chủng	Địa phương thu mẫu	Đường kính phân giải CMC (cm)	Đường kính phân giải tinh bột (cm)
AG	Tỉnh An Giang	$4,10\pm0,20^{a}$	$3,13\pm0,06^{ab}$
BL	Tỉnh Bạc Liêu	$2,83\pm0,21^{de}$	$2,20\pm0,53^{d}$
BT	Tỉnh Bến Tre	$3,17\pm0,35^{bcd}$	$2,50\pm0,36^{cd}$
CT	Thành phố Cần Thơ	$2,90\pm0,36^{de}$	$2,87\pm0,32^{abc}$
DT1	Tỉnh Đồng Tháp	$2,40\pm0,17^{e}$	$2,67\pm0,30^{bcd}$
DT2	Tỉnh Đồng Tháp	$3,10\pm0,17^{cd}$	$2,43\pm0,42^{cd}$
HG	Tỉnh Hậu Giang	$3,03\pm0,25^{cd}$	$2,70\pm0,26^{bcd}$
KG	Tỉnh Kiên Giang	$3,73\pm0,61^{ab}$	$2,63\pm0,15^{bcd}$
ST	Tỉnh Sóc Trăng	$3,53\pm0,31^{abc}$	$2,53\pm0,15^{cd}$
TG	Tỉnh Tiền Giang	$3,87\pm0,46^{a}$	$3,23\pm0,21^{a}$
TV	Tỉnh Trà Vinh	$3,20\pm0,26^{bcd}$	$2,47\pm0,25^{cd}$
VL	Tỉnh Vĩnh Long	$3,00\pm0,62^{cde}$	$2,67\pm0,42^{bcd}$

Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột của từng chủng, các giá trị có chữ cái mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức α=0,05. Mười hai mẫu nấm mối đen được thu thập từ các địa danh trong bảng tại thời điểm trước 01/7/2025.

Vùng halo hay còn gọi là quầng sáng được hình thành do quá trình thủy phân cellulose CMC dưới tác động của enzyme cellulase do nấm tiết ra và thấy rõ khi môi trường được nhuộm bằng dung dịch iod (Hình 4. A-B). Vào ngày thứ 6, đường kính của vùng halo dao động từ 2,40±0,17 cm (chủng DT1) đến 4,10±0,20 cm (chủng AG). Nổi bật là AG, TG, KG và ST có khả năng tạo quầng thủy phân tốt với đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 4,10 cm, 3,87 cm, 3,73 cm và 3,53 cm (Bảng 1). Khi được nuôi cấy trong cùng một môi trường, nồng độ CMC và thời gian nuôi cấy, sự khác biệt giữa các vòng thủy phân có thể phản ánh khả năng khác nhau trong việc tiết enzyme cellulase và cũng như hiệu quả phân hủy cellulose của các chủng phân lập [13]. So với kết quả nghiên cứu của Lưu Khánh Linh (2018) [14], đường kính vòng phân giải cellulose của nấm rơm khoảng 2,6-4,8 cm. Kết quả có xu hướng cao hơn so với nấm mốc trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Thủy và Nguyễn Tiến Long (2017) [15] với đường kính vòng halo trong khoảng 2,1-2,4 cm. Nghiên cứu của Ngô Thanh Phong và cs (2021) [16] về khả năng phân giải cellulose trên môi trường CMC cho thấy, 3 chủng nấm được phân lập từ ruột mối thợ và mối lính đều có khả năng phân giải CMC trên 50%.

Bên cạnh cellulase, amylase cũng là một enzyme quan trọng đối với nấm. Sau 6 ngày ủ, đĩa thạch được cạo sạch sợi nấm và nhuộm với dung dịch iod để quan sát sự xuất hiện của đường kính phân giải xung quanh khuẩn lạc, đường kính vùng phân giải được sử dụng như chỉ tiêu sàng lọc bán định lượng khả năng thủy phân tinh bột

của các chủng phân lập [17]. Khả năng tạo quầng vầng trên môi trường bổ sung tinh bột của 12 chủng nấm mối đen ở bảng 1 cho thấy, đường kính thủy phân dao động từ 2,20±0,53 cm đến 3,23±0,21 cm, trong đó có 3 chủng có đường kính thủy phân lớn nhất là TG (3,23±0,21 cm), AG (3,13±0,06 cm) và CT (2,87±0,32 cm), các kết quả này không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Đường kính vòng phân giải tinh bột của 2 chủng AG và TG được thể hiện ở hình 3 (C-D). Nấm hương, nấm mỡ và nấm gà rừng có khả năng thủy phân tinh bột thông qua việc sản xuất lượng lớn amylase, riêng với nấm hương sau 7 ngày lượng amylase có thể đạt tới 624 U/mL [18].



Hình 3. Đường kính vòng phân giải cellulose (1) và tinh bột (2) của chủng AG (A, C) và chủng TG (B, D)

Dựa trên kết quả sàng lọc về khả năng thủy phân CMC và tinh bột, kết hợp với các tiêu chí lựa chọn đã được xác định, hai chủng AG và TG được lựa chọn để định danh và tiếp tục được đánh giá trên môi trường nhân giống cấp 1 và cấp 2.

3.3. Định danh các chủng nấm tuyển chọn được bằng phương pháp giải trình tự

Trình tự vùng ITS của hai chủng nấm AG và TG được khuếch đại bằng cặp mồi ITS1/ITS4 và được so sánh với các trình tự có sẵn trên cơ sở Genbank (NCBI) bằng công cụ nucleotide BLAST (Bảng 2). Kết quả phân tích BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy, trình tự vùng ITS của cả hai chủng AG và TG có mức độ tương đồng cao với *Hymenopellis radicata* (nấm mối đen). Cụ thể, trình tự ITS của chủng AG có chiều dài 780 bp, với độ phủ 100% và mức độ tương đồng 100% với trình tự ITS của nấm mối đen có mã số truy cập GenBank MK169231.1. Tương tự, trình tự ITS của chủng TG có chiều dài 644 bp, độ phủ 100% và mức độ tương đồng 100% với cùng trình tự tham chiếu của nấm mối đen (mã số truy cập GenBank MK169231.1). Như vậy, kết quả định danh chủng AG và TG tương đồng với trình tự của nấm mối đen.

Bảng 2. Mức độ tương đồng của trình tự chủng nấm AG và TG với dữ liệu trên NCBI

Tên chủng so sánh	Độ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)	Mã số trên GenBank (Accession)
Chủng nấm AG			
Hymenopellis radicata voucher CNF 1/7275	100	100	MK169231.1
Hymenopellis radicata strain IJFM A160	100	99,87	OL739379.1
Uncultured *Xenrula* genomic DNA	99	99,87	HF675363.1
Hymenopellis radicata strain LE-BIN	97	99,47	MK795851.1
Chủng nấm TG			
Hymenopellis radicata voucher CNF 1/7275	100	100	MK169231.1
Hymenopellis radicata strain IJFM A160	100	99,84	OL739379.1
Hymenopellis cf. *radicata* strain	100	99,84	MK028425.1
Uncultured *Xenrula* genomic DNA	100	99,84	HF675363.1

3.4. Sự sinh trưởng và phát triển của nấm mối đen trên môi trường nhân giống cấp 1

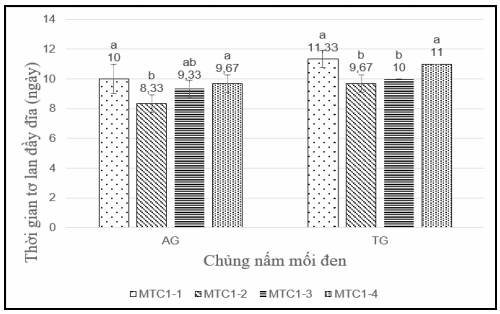
Sự sinh trưởng và phát triển của các sinh vật nói chung và nấm nói riêng bị ảnh hưởng trực tiếp bởi thành phần và hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy [19]. Sự sinh trưởng hệ sợi nấm mối đen của 2 chủng AG và TG trên môi trường nhân giống cấp 1 có thành phần dinh dưỡng bổ sung khác nhau được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Đường kính hệ sợi của chủng AG và TG trên môi trường nhân giống cấp 1

Môi trường	Đường kính phát triển của hệ sợi (cm) theo thời gian		
	4 ngày	6 ngày	8 ngày
Chủng AG			
MTC1-1	2,57±0,06^{b}	4,90±0,10^{c}	7,37±0,12^{c}
MTC1-2	3,57 0,15^{a}	6,17±0,15^{a}	8,83±0,06^{a}

Môi trường	Đường kính phát triển của hệ sợi (cm) theo thời gian		
	4 ngày	6 ngày	8 ngày
MTC1-3	3,33±0,15[a]	5,87±0,21[b]	8,40±0,20[b]
MTC1-4	2,67±0,25[b]	5,07±0,15[c]	7,60±0,10[c]
Chủng TG			
MTC1-1	1,73±0,06[c]	3,97±0,25[c]	7,27±0,38[b]
MTC1-2	2,83±0,35[a]	5,67±0,29[a]	8,07±0,32[a]
MTC1-3	2,43±0,12[b]	4,93±0,29[b]	7,73±0,25[ab]
MTC1-4	2,30±0,10[b]	4,93±0,23[b]	7,53±0,05[b]

Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột của từng chủng, các giá trị có chữ cái mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức α=0,05.

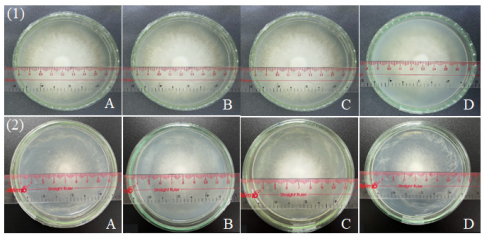


Hình 4. Biểu đồ thời gian hệ tơ nấm lan đầy của hai chủng nấm mối AG và TG

Ghi chú: Giá trị trong hình là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một chủng, các giá trị có chữ cái mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức α=0,05.

Nhìn chung, ở 4 ngày đầu nuôi cấy là thời gian để các chủng nấm có thể thích nghi và hệ sợi nấm bắt đầu sinh trưởng. MTC1-2 cho kết quả cao nhất ở phần lớn các thời điểm khảo sát, tuy ở một số thời điểm (AG ngày 4; TG ngày 8) không khác biệt có ý nghĩa với MTC1-3. Ở ngày nuôi thứ 8, trung bình chiều dài hệ sợi của chủng AG đạt 8,83±0,06 cm và chủng TG cũng đạt chiều dài 8,07±0,32 cm. Tuy nhiên, đường kính đĩa nuôi cấy là 9 cm, do đó giá trị 8,83±0,06 cm của chủng AG trên MTC1-2 sau 8 ngày đã gần đạt giới hạn không gian (98,1%). Kết quả nghiên cứu của Alam và cs (2009) [20] với các giống nấm trên các môi trường cấp 1 khác nhau cho thấy, môi trường gồm peptone, glucose và chiết xuất nấm men là môi trường tối ưu để sợi nấm hình thành và phát triển.

Kết quả ở hình 4 cho thấy, môi trường MTC1-2 cho thời gian tơ lan đầy đĩa ngắn nhất ở cả hai chủng AG và TG ($p<0,05$). Kết quả thực nghiệm cho thấy, việc bổ sung nước dừa trong MTC1-2 có vai trò thúc đẩy tốc độ phát triển hệ sợi nấm nhờ vào một số khoáng chất, vitamin có sẵn trong nước dừa và pH trong nước dừa cũng phù hợp cho nhu cầu sinh lý của nấm mối đen [21, 22]. Tiếp theo, môi trường MTC1-3, đối với chủng AG và các môi trường MTC1-3 và MTC1-4 đối với chủng TG, cũng ghi nhận khả năng hỗ trợ phát triển hệ sợi tốt, điều này có thể liên quan đến việc các môi trường này cung cấp nguồn nitơ, vitamin, axit amin và các khoáng chất đóng vai trò cofactor. So với môi trường đối chứng MTC1-1, môi trường cơ bản dành cho nuôi cấy nấm, tất cả các môi trường có bổ sung thêm thành phần dinh dưỡng đều cải thiện đáng kể sự phát triển của hệ sợi nấm.



Hình 5. Hệ sợi chủng AG (1) và chủng TG (2) trên môi trường khác nhau sau 8 ngày nuôi cấy. A: MTC1-1; B: MTC1-2; C: MTC1-3; D: MTC1-4

Kết quả ở hình 5 cho thấy, khả năng sinh trưởng của hệ sợi ở hai chủng AG và TG tại ngày thứ 8, phản ánh khả năng sinh trưởng mạnh của cả hai chủng. Tuy nhiên, xét về đặc điểm hình thái, hệ sợi của chủng AG phát triển tốt hơn so với chủng TG, với cấu trúc dày và mật độ sợi cao hơn trên bề mặt môi trường cho thấy sự khác biệt về đặc tính sinh trưởng và khả năng thích nghi của hai chủng trong cùng điều kiện nuôi cấy. Tóm lại, việc chọn nguồn dinh dưỡng thích hợp để nấm phát triển đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu cũng như phát triển các quy trình ứng dụng sau này, như vậy môi trường PGA có bổ sung 20% nước dừa được chọn làm môi trường nhân giống cấp 1 do tốc độ sinh trưởng

của hệ sợi nấm nhanh, dày với thành phần môi trường dễ tìm và giá thành rẻ.

3.5. Kết quả sự sinh trưởng hệ sợi nấm trên môi trường nhân giống cấp 2 (meo nấm)

Chiều dài của hệ sợi trên môi trường nhân giống cấp 2 (meo nấm) của hai chủng được ghi nhận từ ngày thứ 14 sau khi cấy được tổng hợp ở bảng 4. Chiều dài tơ của cả chủng AG và TG đều tăng dần theo thời gian nuôi cấy ở tất cả các môi trường khảo sát. Ở chủng AG, sau 14 ngày, chiều dài tơ khoảng 1,60-4,70 cm, tăng lên 4,57-6,63 cm sau 20 ngày và 7,60-8,50 cm sau 26 ngày. Tương tự, ở chủng TG, chiều dài tơ sau 26 ngày cũng đạt 7,63-8,50 cm. Kết quả cho thấy, chủng TG đạt chiều cao tối đa của túi cơ chất chậm hơn so với chủng AG. Trong giai đoạn đầu, tơ nấm phát triển chậm do cần thời gian thích nghi với cơ chất mới nên hệ sợi mỏng, phân bố thưa và thường hình thành lớp tơ trắng mịn lan dần từ tâm ra rìa môi trường. Khi thời gian nuôi cấy kéo dài, tốc độ sinh trưởng tăng lên và tăng rõ rệt về chiều dài tơ. So sánh giữa các môi trường cho thấy MTC2-2 và MTC2-3 cho chiều dài tơ cao hơn so với MTC2-1 ở hầu hết các thời điểm với cả hai chủng và sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p<0,05$).

Bảng 4. Sự sinh trưởng hệ sợi của chủng AG và TG trên môi trường nhân giống cấp 2

Môi trường	Chiều dài trung bình của tơ nấm (cm) theo thời gian		
	14 ngày	20 ngày	26 ngày
Chủng AG			
MTC2-1	$1,60\pm0,10^{b}$	$4,57\pm0,38^{b}$	$7,60\pm0,46^{b}$
MTC2-2	$4,67\pm0,21^{a}$	$6,47\pm0,35^{a}$	$8,27\pm0,21^{a}$
MTC2-3	$4,70\pm0,35^{a}$	$6,63\pm0,15^{a}$	$8,50\pm0,17^{a}$
Chủng TG			
MTC2-1	$1,63\pm0,12^{b}$	$4,67\pm0,21^{b}$	$7,63\pm0,51^{c}$
MTC2-2	$3,80\pm0,76^{a}$	$6,17\pm0,85^{a}$	$8,50\pm0,24^{a}$
MTC2-3	$4,76\pm0,42^{a}$	$6,47\pm0,42^{a}$	$8,00\pm0,40^{ab}$

Ghi chú: Giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Trong cùng một cột của từng chủng, các giá trị có chữ cái mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$.

Hai môi trường MTC2-2 và MTC2-3 có bổ sung bắp hạt cho thấy, khả năng sinh trưởng cao hơn ở cả hai chủng AG và TG so với môi trường MTC2-1 trong phần lớn thời gian khảo sát, sự khác biệt này có thể liên quan đến sự khác nhau về thành phần và khả năng cung cấp dinh dưỡng của các loại cơ chất, đặc biệt là nguồn carbon dễ hấp thu, từ đó thúc đẩy quá trình kéo dài sợi nấm và tăng trưởng hệ sợi. So sánh kết quả nghiên cứu này với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Thạnh và cs (2019) [23] cho thấy, nấm Hoàng Kim (*Pleurotus citrinopileatus*) có khả năng sinh trưởng của hệ sợi nhanh nhất trên môi trường bắp. Kết quả nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, sử dụng hạt bắp làm giá thể ở giai đoạn nuôi bào tử nấm Hoàng Đế (*Calocybe indica*) đạt hiệu quả sinh trưởng tốt nhất ở thời điểm ngày 20 sau khi cấy giống [24].

Đánh giá tơ nấm trên bề mặt cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các môi trường nuôi cấy. Ở thành phần môi trường MTC2-1, tơ nấm mọc thưa, phân bố không đồng đều và độ bao phủ bề mặt kém, đồng thời khả năng bện kết yếu. Ngược lại, ở MTC2-2 và MTC2-3, hệ sợi phát triển dày, đồng đều và bao phủ tốt toàn bộ bề mặt môi trường. Sự khác biệt này cho thấy, chất lượng sinh trưởng của tơ nấm không chỉ phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của hệ sợi mà còn liên quan chặt chẽ đến khả năng phân nhánh và tích lũy sinh khối. Hiện tượng tơ mọc thưa và không đồng đều ở MTC2-1 có thể do môi trường này (chủ yếu chứa lúa) chưa cung cấp đầy đủ hoặc cân đối các thành phần dinh dưỡng cần thiết cho quá trình phân nhánh khuẩn ty. Ngược lại, sự bổ sung bắp hạt trong MTC2-2 và MTC2-3 giúp cung cấp nguồn dinh dưỡng phong phú hơn, hỗ trợ cả quá trình kéo dài và phân nhánh sợi nấm, từ đó hình thành hệ sợi dày và ổn định hơn. Môi trường MTC2-2 cho giá trị cao nhất ở chủng TG, trong khi AG đạt giá trị cao nhất ở MTC2-3, cả hai đều đạt 8,50 cm.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và định danh thành công hai chủng nấm mối đen bao gồm AG và TG, đồng thời ghi nhận khả năng thủy phân cellulose và tinh bột của hai chủng này. Môi trường thạch PGA bổ sung 20% nước dừa được xác định là phù hợp cho giai đoạn nhân giống cấp 1, giúp duy trì và phát triển hệ sợi ổn định cho cả hai chủng. Ở giai đoạn nhân giống cấp 2, các môi trường

chứa bắp hạt có bổ sung $CaCO_3$ hoặc phối trộn bắp hạt - lúa bổ sung $CaCO_3$ cho sự phát triển hệ sợi tốt hơn, với mật độ dày và phân bố đồng đều. Những kết quả này là cơ sở để lựa chọn và xây dựng quy trình nhân giống phù hợp cho các chủng nấm mối đen AG và TG, góp phần duy trì sự phát triển ổn định của hệ sợi và tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

4.2. Kiến nghị

Trong phạm vi nghiên cứu hiện tại, do chưa có dữ liệu về tỷ lệ nhiễm tạp, khả năng phục hồi sau cấy chuyền, khả năng hình thành quả thể và hiệu suất sinh học, kết luận chỉ giới hạn ở khả năng sinh trưởng và lan tơ trong túi nuôi. Vì vậy, các kết quả thu được chỉ mang tính định hướng ban đầu và cần được kiểm chứng thêm ở quy mô lớn hơn, đồng thời đánh giá đầy đủ các chỉ tiêu chất lượng meo. Trong các nghiên cứu tiếp theo, bên cạnh việc đánh giá sự phát triển của tơ nấm và các đặc điểm hình thái, cần theo dõi có hệ thống các điều kiện nuôi cấy và bổ sung các chỉ tiêu như tỷ lệ nhiễm tạp, khả năng phục hồi sau cấy chuyền, khả năng hình thành quả thể và hiệu suất sinh học để có cơ sở đánh giá toàn diện hơn chất lượng và tiềm năng ứng dụng của meo nấm.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí nghiên cứu từ đề tài khoa học và công nghệ Bộ Giáo dục và Đào tạo (mã số: B2025-TCT-11).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Trần Thị Thu Thủy, Võ Trần Khánh Huyền, Vũ Thùy Dương, Phạm Châu Huỳnh (2024). Chọn giống và thực nghiệm trồng *Hymenopellis radicata* (nấm mối đen) trên nguồn cơ chất thông dụng địa phương tại thành phố Đà Nẵng. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 21*(12), 1592-1600.

[2]. Nguyễn Thị Bích Thùy, Trịnh Tam Kiệt (2008). Nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm trắng rễ dài *Oudemansiella radicata*. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, Chuyên san Công nghệ sinh học*, *4*(0866-8566), 74.

[3]. Niego A. G. T., Thongklang N., Hyde K. D. & Raspé O. (2023). Introduction of two novel species of *Hymenopellis* (Agaricales, Physalacriaceae) from Thailand. *MycoKeys, 98*, 253-271.

[4]. Pepe, M., Hesami, M., Fleishmann, L., Hsiang, T. & Jones, A. M. P. (2025). Mycelium growth and development of *Psilocybe* spp. mother cultures on agar-based media. *Journal of Fungi, 11*(6), 450.

[5]. Singh, W. R., Sagolshemcha, R., Devi, T. P. & Asem, I. D. (2025). Culture of mycelium, production of spawn, and the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Current Agriculture Research Journal, 13*(1), 73-77.

[6]. Dong, H. T., Akbar, D., Li, Y. & Xu, C. Y. (2026). Mushroom spawn and its effects on mushroom growth and development: A systematic review. *Agronomy*, *16*(3), 391.

[7]. Nguyễn Thị Ngọc Nhi, Trần Nhân Dũng (2016). Phân lập giống nấm mối *Termitomyces clypeatus*. *Tap chí Khoa học, Đại học Cần Thơ, 46b*, 17-22.

[8]. Nguyễn Lân Dũng, Đoàn Xuân Mượm, Nguyễn Phùng Tiến (1972). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật.* Tập I. Nxb Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

[9]. Võ Phương Mai, Nguyễn Duy Tân, Nguyễn Hữu Thanh, Nguyễn Phú Thọ (2025). Tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase cao nhất từ cơm rượu và là một tiềm năng cho công nghiệp enzyme. *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm, 21*(3), 45-55.

[10]. Niego A.G., Raspé O., Thongklang N., Charoensup R., Lumyong S. & Stadler M. (2021). Taxonomy, diversity and cultivation of the Oudemansielloid/Xeruloid taxa *Hymenopellis, Mucidula, Oudemansiella*, and *Xerula* with respect to their bioactivities: A review. *Journal of Fungi*, *7*(1), 51.

[11]. Petersen, R. H., Hughes, K. W. (2010). The *Xerula/Oudemansiella* complex (Agaricales). In Nova Hedwigia Beiheft. J. Cramer Science Publishers: Germany. Volume 137, 625 pages.

[12]. Anagnostakis, S. L. & Hankin, L. (1975). Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. *Journal of Milk and Food Technology*, *38*, 570-572.

[13]. Subramaniyam, R. & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Natural Sciences, 3*(3), 480-486.

[14]. Lưu Khánh Linh (2018). Phân lập và tuyển chọn chủng nấm rơm (*Volvariella volvacea*) có khả năng phân giải cellulase từ rơm rạ tại các tỉnh lưu vực sông Mekong. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.

[15]. Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Tiến Long (2017). Vi sinh vật phân giải cellulose mạnh trong sản xuất phân hữu cơ từ phế phụ phẩm nông nghiệp và ảnh hưởng của chúng đối với giống lạc L14 tại Hương Trà, Thừa Thiên

Huế. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 127*(3B), 5-19.

[16]. Ngô Thanh Phong, Nguyễn Thị Cẩm Vân, Nguyễn Huỳnh Thúy Diệu, Bùi Thế Vinh (2021). Xác định khả năng phân giải cellulose của các chủng vi khuẩn, nấm phân lập từ ruột mối (*Microcerotermes* spp.) thu nhận ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ, 57*(4), 65-72.

[17]. Omemu, A. M., Bamigbade, G., Obadina, A. O. & Obuotor, T. M. (2015). Isolation and screening of amylase from moulds associated with the spoilage of some fermented cereal foods. *Microbiology Research Journal International, 5*(4), 359-367.

[18]. El-Zalaki, M. & Hamza, M. (1979). Edible mushrooms as producers of amylases. *Food Chemistry*, *4*(3), 203-211.

[19]. Trần Thị Trúc, Đỗ Tấn Khang, Bùi Thị Minh Diệu và Trần Nhân Dũng (2019). Khảo sát ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng đến sinh trưởng và phát triển của nấm chân dài *Panus giganteus* (Berk.) Corner. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ.* Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học (2), *55*, 110-118.

[20]. Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. & 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.

[21]. Arip, A. G. & Wulandari, A. (2021). The use of coconut water (*Cocos nucifera* L.) as alternative media to substitute Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for the growth of *Aspergillus flavus*. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 819, 012061.

[22]. Evangelista, F. R., Chairez, I., Sierra, S., Lara, H. L., Martínez-González, C. R. & Garín Aguilar, M. E. (2021). A novel coconut-malt extract medium increases growth rate of morels in pure culture. *AMB Express*, *11*, 167.

[23]. Nguyễn Hoàng Thạnh, Nguyễn Tường Vi, Trần Nhân Dũng, Đỗ Tấn Khang (2019). Nghiên cứu môi trường và giá thể phù hợp để sản xuất nấm Hoàng Kim (*Pleurotus citrinopileatus* Singer). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ.* Số chuyên đề: Công nghệ sinh học (2), *55*, 95-102.

[24]. Trần Thanh Thy, Lê Văn Vàng (2022). Nghiên cứu môi trường và giá thể phù hợp để sản xuất nấm hoàng đế (*Calocybe indica* APK2). *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ, 58*(2), 185-193.

ISOLATION, SELECTION AND EVALUATION OF THE MEDIA FOR CULTIVATION OF BLACK TERMITE MUSHROOM (*Hymenopellis radicata*)

Nguyen Ngoc Thanh[1], Le Huynh Truc Vi[1], Dao Thi Yen Vy[1], Duong Thi My Duyen[1], Nguyen Hoang Quoc Tai[1], Luu Minh Chau[1], Tran Minh Phuc[2], Tran Thi Giang[1], Huynh Xuan Phong[1]

[1]*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

[2]*Faculty of Agricultural Technology, Vinh Long University of Technology and Engineering*

Abstract

This study aimed to select potential black termite mushroom strains with high cellulase and amylase activities, and to evaluate the effects of culture media on mycelial growth at primary and secondary spawn. The hydrolytic activities of cellulose and starch were assessed using CMC agar and starch agar, respectively. After isolation and screening, the strains were identified based on ITS region sequences. The results indicated that both AG and TG strains were identified as *Hymenopellis radicata*, showing high sequence identity with the reference sequences. At primary spawn, mycelial growth was evaluated on PGA medium supplemented with different additives. At the second spawn, the selected strains were cultivated on various substrates, including rice grains, corn kernels, and a rice-corn mixture supplemented with $CaCO_3$, to determine suitable media for mycelial development. The results indicated that the two strains, AG and TG, exhibited strong cellulolytic and amylolytic activities. At the primary spawn, both strains showed optimal growth on PGA supplemented with 20% coconut water, with colony diameters of 8.83±0.06 cm (AG) and 8.07±0.32 cm (TG). At the secondary spawn, MTC2-2 and MTC2-3 media were more suitable for mycelial growth, with maximum mycelial lengths reaching 8.50±0.24 cm after 26 days of cultivation.

Keywords: *Edible mushroom, black termite mushroom, mushroom cultivation, Hymenopellis. Radicata.*

Ngày nhận bài: 25/6/2026

Ngày chuyển phản biện: 6/7/2026

Ngày thông qua phản biện: 12/8/2026

Ngày duyệt đăng: 7/9/2026