

## THÀNH PHẦN VI NẤM KÍ SINH TRÊN CÁ TRA GIỐNG (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Đặng Thụy Mai Thy, Phạm Minh Đức và Trần Thị Tuyết Hoa

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/01/2016

Ngày chấp nhận: 25/07/2016

### Title:

Identification of filamentous fungi effecting striped catfish fingerling (*Pangasianodon hypophthalmus*)

### Từ khóa:

Cá tra giống, *Pangasianodon hypophthalmus*, vi nấm, sinh học

### Keywords:

Striped catfish fingerling, *Pangasianodon hypophthalmus*, fungi, biology

### ABSTRACT

The research was carried out to investigate fungal infections on striped catfish fingerling (*Pangasianodon hypophthalmus*). Fungi was isolated from the diseased fish and inoculated on two culture media: Glucose Yeast agar and Potato dextrose agar; the inoculated plates were incubated for 5-7 days at 28-30°C. The results showed that five fungal genera were identified such as *Fusarium sp.* (40.9%), *Aspergillus sp.* (27.3%), *Achlya sp.* (20.5%), *Saprolegnia sp.* (6.8%) and *Mucor sp.* (4.5%). The results also indicated that *Fusarium sp.* and *Aspergillus sp.* were found in most of the organs of fish; however, *Achlya sp.*, *Saprolegnia sp.* and *Mucor sp.* were found only in muscles and gills. The prevalence of infection is various in gills (61.4%), swim bladder (19.3%), muscle (8%) and liver (8%). The optimal temperature of the fungal growth ranged from 28°C to 33°C. *Fusarium sp.* grew at 35°C after seven days of inoculation, meanwhile the others grew until 38°C. pH from 5.0 to 7.0 is suitable for the growth of isolated fungi. The fungi can use glucose, sucrose and maltose.

### TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm xác định thành phần vi nấm nhiễm trên cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). Nấm được phân lập từ cá bệnh trên hai môi trường gồm glucose yeast agar (GYA) và potato dextrose agar (PDA) và được ủ từ 5-7 ngày ở 28-30°C. Kết quả cho thấy nấm giống nấm đã được định danh gồm *Fusarium sp.* (40,9%), *Aspergillus sp.* (27,3%), *Achlya sp.* (20,5%), *Saprolegnia sp.* (6,8%) *Mucor sp.* (4,5%). *Fusarium sp.* và *Aspergillus sp.* nhiễm trên các cơ quan nhưng *Achlya sp.*, *Saprolegnia sp.* và *Mucor sp.* chỉ nhiễm ở mang và cơ. Tỷ lệ nhiễm ở các cơ quan khác nhau trong đó mang (61,4%), bóng hơi (19,3%), cơ (8%) và gan (8%). Nhiệt độ tối ưu cho vi nấm phát triển từ 28-33°C. *Fusarium sp.* phát triển đến 35°C sau 7 ngày nhưng các giống vi nấm còn lại có thể tồn tại đến 38°C. pH 5-7 thích hợp cho các chủng nấm phát triển. Nấm sử dụng glucose, sucrose và maltose.

Trích dẫn: Đặng Thụy Mai Thy, Phạm Minh Đức và Trần Thị Tuyết Hoa, 2016. Thành phần vi nấm kí sinh trên cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 44b: 48-57.

## 1 GIỚI THIỆU

Vi nấm là một trong các tác nhân gây bệnh ở động vật thủy sản. Các nghiên cứu cho thấy vi nấm gây bệnh trên cá tôm nước ngọt và lợ mặn chủ yếu gồm vi nấm bậc thấp và vi nấm bậc cao. Vi nấm bậc thấp với đa dạng thành phần loài gây bệnh ở các giai đoạn khác nhau trên các loài cá tôm trong đó điển hình là nhóm nấm nước *Saprolegnia* (Bruno and Woo, 1994). Có 8 giống nấm được báo cáo gây nhiễm ở cá nuôi và trong tự nhiên bao gồm: *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Calyptrotheca*, *Thraustotheca*, *Leptolegnia*, *Pythiopsis* và *Leptomitosis* nhưng chỉ có 3 giống *Saprolegnia*, *Achlya* và *Aphanomyces* thường gây bệnh trong thủy sản (Bly *et al.*, 1992; Hatai and Hoshiiai, 1994). Vi nấm bậc cao chủ yếu là nấm bất toàn cũng gây hại cho các loài thủy sản nuôi và trong tự nhiên. *Fusarium solani*, *F. moniliforme* và *F. oxysporum* được tìm thấy ở tôm he Nhật bệnh đen mang (Hatai and Egusa, 1978; Rhoobunjongde *et al.*, 1991; Khoa and Hatai, 2005). *F. moniliforme* và *F. udum* được phát hiện gây bệnh trên một số loài cá nuôi nước ngọt như *Barbus rana*, *Channa punctatus*, *Labeo rohita*, *Mastacembelus armatus*, *Mystus tengra*, *Puntius sophore* và *Wallago attu* ở Ấn Độ (Deepa *et al.*, 2000).

Nghiên cứu vi nấm gây bệnh ở cá đã và đang bắt đầu trong những năm gần đây ở Việt Nam. Báo cáo bệnh ở cá rô đồng bị nấm nhớt có các dấu hiệu như nhiều nhớt trên thân, vây xù xì và có nhiều đốm đỏ đã phân lập được ba giống nấm gồm *Fusarium*, *Acremonium* và *Geotrichum* (Trần Ngọc Tuấn và Phạm Minh Đức, 2010). Kết quả khảo sát mầm bệnh trên cá lóc nuôi thâm canh trong ao cho thấy các giống vi nấm chỉ xuất hiện ở 3 tháng nuôi đầu tiên, đặc biệt vi nấm *Achlya* duy nhất xuất hiện ở tháng nuôi thứ 1 và 3, giống vi nấm còn lại là *Acremonium*, *Fusarium* và *Geotrichum* mới được phân lập lần đầu tiên trên cá lóc nuôi thâm canh (Phạm Minh Đức và *ctv.*, 2012). Năm 2013, đã phát hiện vi nấm bậc cao *Fusarium* sp. nhiễm trên cá tra nuôi thương phẩm có các dấu hiệu bệnh lý như lở đờ, bỏ ăn và bụng trương to (Phạm Minh Đức và *ctv.*, 2013). Bệnh do vi nấm ở Việt nam trở nên phổ biến trong thời gian gần đây nhưng những nghiên cứu về vi nấm trên các loài cá nuôi vẫn còn nhiều hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu thực hiện nhằm xác định thành phần vi nấm nhiễm trên cá tra giống.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp thu mẫu

Cá tra giống có khối lượng (10-20 g) được thu tại An Giang, Vĩnh Long và Cần Thơ từ 4/2014 đến 4/2015. Số lượng mẫu thu là 10-15 cá/ao, cá thu có dấu hiệu bệnh lý như lở đờ, bỏ ăn. Mẫu được vận chuyển về phân tích tại phòng thí nghiệm Bộ môn Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản - Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phương pháp phân lập vi nấm

Các cơ quan gồm da, mang, gan và bóng hơi được rửa mẫu bằng nước muối sinh lý vô trùng sau đó cấy lên môi trường GYA (1% glucose, 0,25% yeast-extract và 1,5% agar). Cho một ít mỗi loại kháng sinh ampicilline và streptomycine xung quanh mẫu và ủ mẫu ở 28°C trong 5-7 ngày. Vi nấm phát triển ở các cơ quan được cấy chuyển trên môi trường GYA để có chủng vi nấm thuần (Hatai and Egusa, 1978). Chọn 1 chủng vi nấm của mỗi giống nấm phân lập được từ cá để thí nghiệm đặc điểm sinh học.

### 2.3 Phương pháp định danh vi nấm

Vi nấm được định danh theo khóa phân loại của Cooker (1923) và de Hoog *et al.* (2000) dựa vào các đặc điểm màu sắc khuẩn lạc trên môi trường GYA, đặc điểm hình thái sợi nấm và kích thước, đặc điểm cuống bào tử và bào tử về hình dạng và kích thước trong quá trình sinh sản của các chủng vi nấm phân lập được.

Phương pháp nuôi cấy nấm bậc thấp sinh sản theo Gams *et al.* (1980). Cắt 2-3 khối agar nấm thuần cho vào môi trường lỏng GY (1% glucose và 0,25% yeast-extract) và ủ ở 28°C khoảng 3-5 ngày. Cắt sợi nấm phát triển rửa 3 lần qua nước cất vô trùng và cho vào đĩa petri có nước vô trùng (25 ml/đĩa) và hạt mè tiếp tục ủ ở 28°C khoảng 18 giờ quan sát hình thái sinh sản vô tính và hữu tính.

Phương pháp nuôi cấy trên lame kính theo de Hoog *et al.* (2000). Dùng dao cắt khối môi trường GYA đặt lên phiến kính bên dưới gác trên que thủy tinh và có lớp giấy thấm trong đĩa petri. Cấy vi nấm vào bốn mặt bên của khối thạch sau đó đặt lamên lên trên khối thạch này. Ủ mẫu ở 28°C trong 5 ngày khi thấy nấm phát triển bao phủ lamên thì nhuộm cotton blue và quan sát dưới kính hiển vi.

## 2.4 Đặc điểm sinh học của vi nấm

### 2.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của vi nấm

Dùng ống cắt số 2 cắt một khối agar đã có nấm thuần phát triển với đường kính khoảng 5,5 mm và đặt khối agar này vào giữa đĩa petri có môi trường GYA. Sau đó, ủ ở các mức nhiệt độ khác nhau 23, 28, 33 và 38°C. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đo đường kính phát triển của khuẩn lạc vi nấm mỗi ngày trong vòng 4 ngày. Chọn mức nhiệt độ có nấm phát triển tốt cho các thí nghiệm tiếp theo (Koeypudsa *et al.*, 2005).

### 2.4.2 Ảnh hưởng của độ mặn đến sự phát triển của vi nấm

Dùng ống cắt số 2 cắt một khối agar đã có nấm thuần phát triển với đường kính khoảng 5,5 mm và đặt khối agar này vào giữa đĩa petri có môi trường GYA với các nồng độ muối khác nhau 0%, 0,5%, 1%, 1,5% và 2% ủ ở nhiệt độ tối ưu được chọn ở thí nghiệm ảnh hưởng của nhiệt độ. Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại và đo đường kính khuẩn lạc của nấm từ 5-7 ngày (Koeypudsa *et al.*, 2005).

### 2.4.3 Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của vi nấm

Môi trường GY lỏng (1% glucose và 0,25% yeast-extract) được điều chỉnh các khoảng pH: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 và 11,0 bằng cách cho thêm dung dịch HCl 1N hoặc dung dịch NaOH 1N. Dùng cork borer No.2 cắt 1 khối agar có nấm thuần với đường kính 5,5 mm cho vào ống nghiệm chứa 5 ml GY lỏng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Quan sát sự phát triển của vi nấm trong 5-7 ngày (Koeypudsa *et al.*, 2005).

### 2.4.4 Khả năng sử dụng carbohydrate của vi nấm

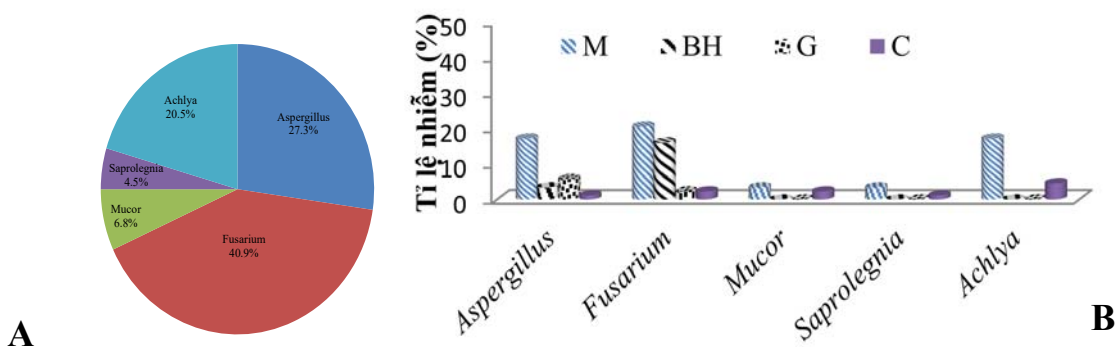
Chuẩn bị môi trường gồm 8,4 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

2,7 mM KCl, và 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,035 mM ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O và 0,02 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O. Bổ sung thêm bromocresol tím vào môi trường làm chất chỉ thị với nồng độ 50 mg/L và môi trường được tiệt trùng ở 121°C trong 10 phút. Bổ sung 1% các loại carbohydrate (glucose, sucrose và maltose) vào môi trường và môi trường đối chứng không bổ sung carbohydrate. Cho 2 ml môi trường vào ống nghiệm 10 ml, và cấy nấm vào và ủ mẫu trong 14 ngày. Môi trường chuyển sang màu vàng hoặc cam cho kết quả dương tính, môi trường màu hồng hoặc tím cho kết quả âm tính (Kitancharoen and Haitai, 1998).

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Thành phần giống loài vi nấm nhiễm trên cá tra giống

Tổng số 116 mẫu cá tra giống được thu ở An Giang, Vĩnh Long và Cần Thơ. Kết quả phân lập được 88 chủng vi nấm phát triển ở các cơ quan như mang, bóng hơi, gan và cơ. Mang có tỉ lệ nhiễm vi nấm cao nhất (61,4%) kể đến ở bóng hơi (19,3%) và thấp nhất ở gan và cơ (8%). Mỗi giống vi nấm khác nhau cũng cho tỉ lệ nhiễm khác nhau ở các cơ quan. Mang và cơ là hai cơ quan nhiễm các nhóm vi nấm như *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Saprolegnia* sp. và *Achlya* sp. Ở bóng hơi và gan phân lập được 2 giống nấm *Aspergillus* sp. và *Fusarium* sp. Trong các nhóm vi nấm nhiễm trên cá tra giống thì *Fusarium* sp. có tỉ lệ cao nhất (40,9%) cũng được tìm thấy nhiều nhất ở mang và bóng hơi. Tỉ lệ nhiễm *Aspergillus* sp. và *Achlya* sp. ở mang là bằng nhau (17%) và thấp nhất là *Saprolegnia* sp. và *Mucor* sp. (3,4%). Tương tự, khi phân lập ở cơ thì tỉ lệ nhiễm của *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. và *Mucor* sp. lần lượt là 4,5; 1,1; 1,1; 2,3 và 2,3% (Hình 1).



Hình 1: A. Tỉ lệ (%) các giống vi nấm nhiễm ở cá tra giống; B. Tỉ lệ nhiễm (%) vi nấm ở các cơ quan của cá tra giống

Vi nấm nhiễm trên động vật thủy sản rất đa dạng về thành phần loài, mức độ nhiễm và khả năng gây thiệt hại khác nhau. Vi nấm phổ biến gồm *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* thường gây bệnh trong thủy sản (Bly *et al.*, 1992; Hatai and Hoshiiai, 1994). Vi nấm *F. oxysporum* cũng được phát hiện trên cá tráp đỏ *Pagrus major* ở Nhật. Các trường hợp cá bệnh đều không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài nhưng bên trong thận sưng và mất màu, các cơ quan khác đều bình thường (Hatai *et al.*, 1986). Nghiên cứu bệnh do nấm ở 13 loài cá ở vùng thượng nguồn ở Ấn Độ cho thấy cá trê *Clarias batrachus* nhiễm nấm với tỉ lệ cao nhất 24,6%. *Aspergillus niger* và *Fusarium* sp. là hai giống vi nấm lần đầu tiên được định danh nhiễm trên cá ở Ấn Độ (Chauhan, 2012). Tương tự, nghiên cứu thành phần nấm gây bệnh trên cá *Catla catla* nuôi thương phẩm đã phân lập được 3 giống gồm *Aspergillus* spp. (78,5%), *Blastomyces* sp. (7,5%) và *Penicillium* sp. (3,5%) và 10,5% vi nấm chưa được định danh. Ở cá *Catla catla* bệnh do nấm có tỉ lệ nhiễm ở các cơ quan mắt 24,32%, mang 18,91%, da và đầu 16,21% (Iqbal and Saleemi, 2013). Hơn nữa, 17 loài cá nước ngọt được thu ở vùng Bhopal cũng nhiễm 21 loài nấm thuộc 9 giống trong đó có *Aspergillus* và *Fusarium* (Chauhan, 2014). Ở Việt Nam, *Fusarium*, *Acremonium* và *Geotrichum* cũng được tìm thấy ở cá rô đồng nuôi thâm canh bị bệnh nấm nhớt hay ở cá lóc nuôi thâm canh trong ao (Trần Ngọc Tuấn và Phạm Minh Đức, 2010; Phạm Minh Đức *et al.*, 2012). *Fusarium* sp. đã được phát hiện ở cá tra nuôi thương phẩm có dấu hiệu bệnh lý như bơi lờ đờ, bỏ ăn, bụng trương to, bên trong nội quan thấy bóng hơi trương to, mềm, có màu vàng sẫm và có dịch vàng (Phạm Minh Đức *et al.*, 2013). Như vậy, lần đầu tiên nghiên cứu đã định danh được vi nấm nhiễm trên cá tra giống đa dạng thành phần giống loài và mức độ nhiễm khác nhau ở các cơ quan.

### 3.2 Đặc điểm hình thái vi nấm nhiễm trên cá tra giống

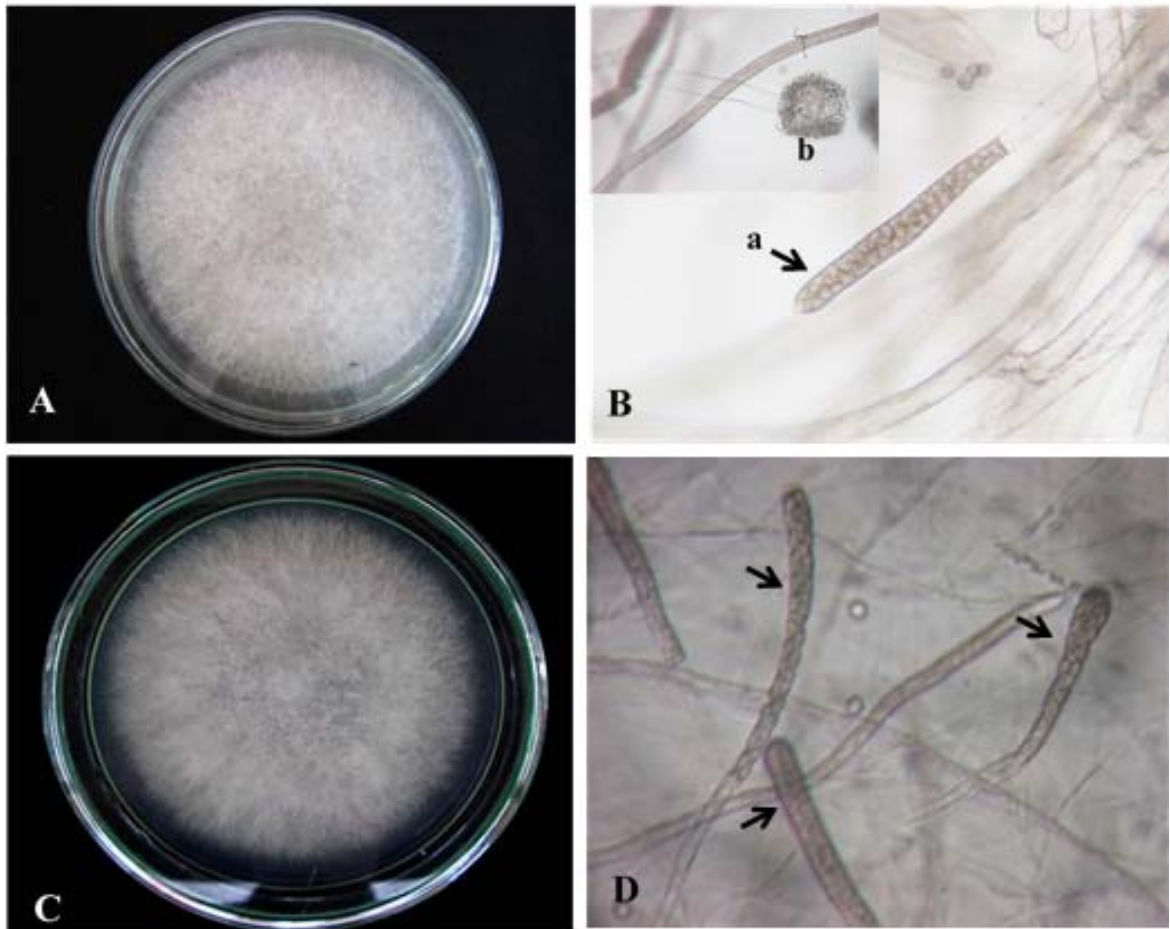
#### *Achlya* sp.

Dựa vào đặc điểm hình thái, sự phát triển của khuẩn lạc, đặc điểm của sợi nấm và bào tử bằng phương pháp sinh sản vô tính và hữu tính định danh vi nấm. Vi nấm có dạng khuẩn lạc màu trắng kem đồng nhất, phát triển nhanh trên môi trường GYA sau 5 ngày nuôi cấy ở 28°C đạt kích thước 82-84 mm (Hình 2A). Vi nấm có dạng sợi, mọc nhô lên khỏi bề mặt môi trường và không có vách ngăn. Kết quả quan sát quá trình sinh sản vô tính cho thấy các túi động bào tử được hình thành sau 12-18 giờ và túi động bào tử có kích thước tương đương hoặc lớn hơn so với sợi nấm. Bên trong túi, các động bào tử di chuyển nhanh đến đầu mút và phóng thích ra ngoài. Các bào tử này có hình cầu và tập trung tại đầu mút của túi động bào tử. Sau đó hình thành động bào tử và có tiên mao sau 18-24 giờ và bơi tự do trong môi trường (Hình 2B).

#### *Saprolegnia* sp.

Vi nấm *Saprolegnia* sp. có khuẩn lạc phát triển nhanh trên môi trường GYA, sau 5 ngày nuôi cấy ở 28°C đường kính trung bình của khuẩn lạc đạt 80-82 mm (Hình 2C). Khuẩn lạc có màu trắng đồng nhất, sợi nấm ngắn, sợi nấm nhỏ mịn, dày đặc mọc nhô lên khỏi bề mặt. Quan sát sinh sản vô tính cho thấy sợi nấm trưởng thành và túi động bào tử được hình thành trên đầu mút của sợi nấm sau 16-18 giờ. Túi động bào tử lớn hơn so với sợi nấm và động bào tử bơi tự do khi được phóng thích (Hình 2D).

Căn cứ vào khóa phân loại của Coker (1923) đã định danh được chủng vi nấm *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. Kết quả tương tự nghiên cứu của Zahura *et al.* (2004) trên một số loài cá nước ngọt ở Bangladesh, trong đó cá tra nhiễm vi nấm chiếm 18% gồm *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. Ngoài ra, Panchai *et al.* (2014) phân lập trên cá rô phi *Oreochromis niloticus* nuôi bè ở Thái Lan cũng nhiễm các loài vi nấm thuộc giống *Achlya* sp.



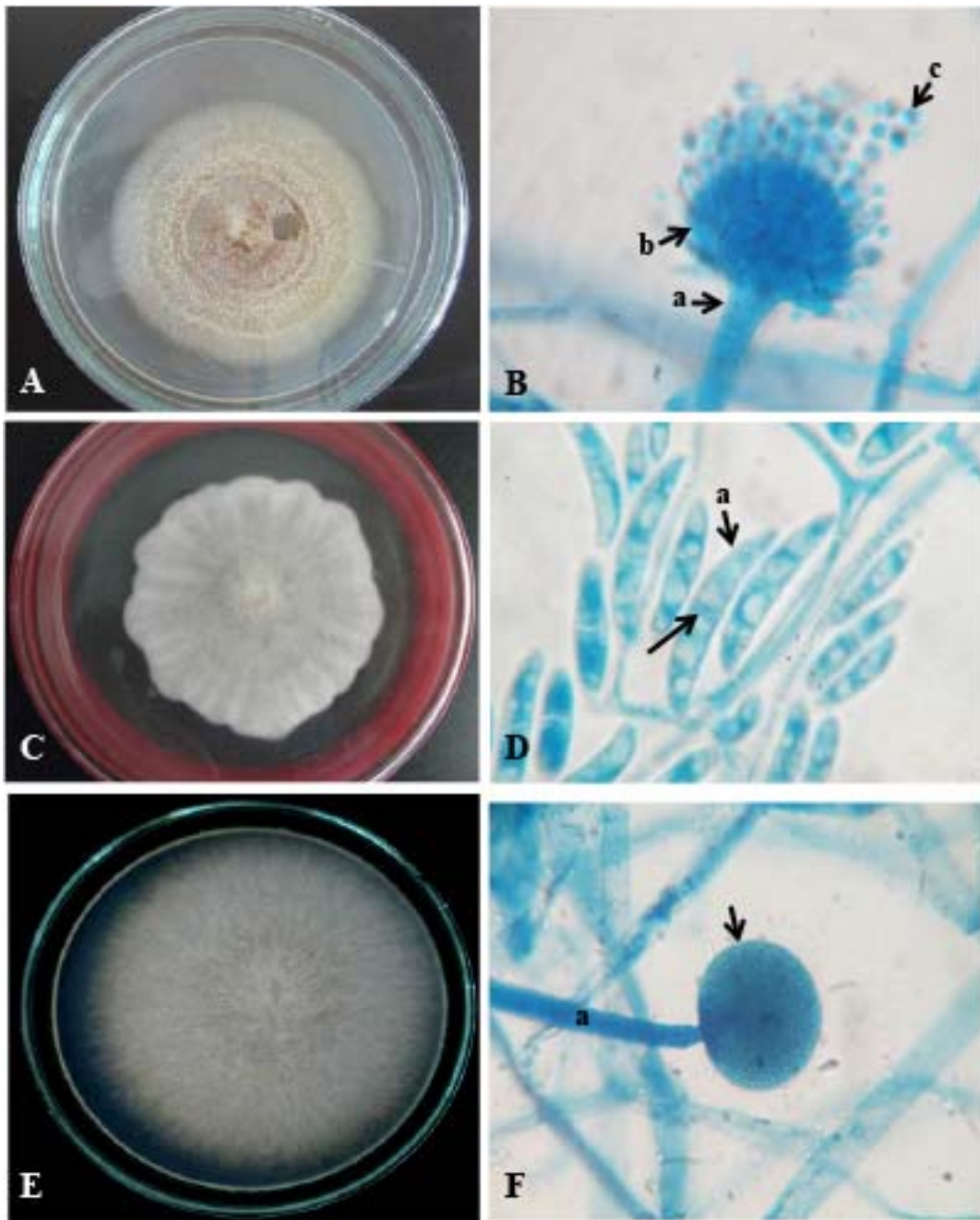
**Hình 2: Đặc điểm hình thái vi nấm *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. nhiễm trên cá tra giống**

A: Khuẩn lạc *Achlya* sp. trên môi trường GYA; B: túi bào tử (a) và bào tử sau khi phóng thích tập trung ở đầu túi bào tử (b); C: Khuẩn lạc *Saprolegnia* sp. trên môi trường GYA; D: các túi bào tử (mũi tên)

*Aspergillus* sp.

Vi nấm *Aspergillus* có khuẩn lạc màu vàng đến nâu, sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường GYA ở nhiệt độ 28 °C đường kính khuẩn lạc 51-54 mm (Hình 3A). Sợi nấm mảnh, có kích cỡ 5-7 μm, phân nhánh và có vách ngang. Cuống đính bào tử

được hình thành từ các đầu mút của sợi nấm. Phía đầu cuống đính bào tử phồng to lên gọi là túi. Từ túi này phân chia thành những tế bào nhỏ, thuôn, dài gọi là những tế bào hình chai (thể bình). Trên các tế bào hình chai này phân chia thành những bào tử tròn dính vào nhau gọi là đính bào tử (Hình 3B).



**Hình 3: Đặc điểm hình thái vi nấm nhiễm trên cá tra giống**

A: Khuẩn lạc *Aspergillus* sp. trên môi trường GYA; B: Cuống bào tử (a), đầu cuống đính bào tử phồng to, thể bình (b), đính bào tử (c); C: Khuẩn lạc *Fusarium* sp. trên môi trường GYA; D: Bào tử vi nấm hình thuyền (a) và có vách ngăn (mũi tên); E: Khuẩn lạc *Mucor* sp. trên môi trường GYA; F: Cuống túi bào tử dài (a), túi bào tử có vách dày, hình cầu (mũi tên)

*Fusarium* sp.

Vi nấm *Fusarium* sp. có khuẩn lạc màu hồng nhạt, sợi nấm màu trắng mọc nhô khỏi môi trường nuôi cấy, khuẩn lạc phát triển sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường GYA ở nhiệt độ 28°C đạt kích thước 75-78 mm (Hình 3C). Sợi nấm có vách ngăn và phân nhánh. Các đại bào tử có hình thuyền hay hình lưỡi liềm, hơi cong và nhỏ về hai đầu, có từ 1 – 5 vách ngăn (Hình 3D).

*Mucor* sp.

Vi nấm *Mucor* sp. có khuẩn lạc phát triển nhanh trên môi trường nuôi cấy GYA ở 28°C sau 3 ngày nuôi cấy có đường kính khuẩn lạc đạt 77-80 mm (Hình 3E). Khuẩn lạc vi nấm màu trắng xám và vàng nhạt ở vùng tâm. Sợi nấm mọc dạng nhô lên cao. Cuống túi bào tử dài không phân nhánh. Túi bào tử có vách dày, hình cầu, tạo ra bào tử dạng vô tính (Hình 3F). Dựa vào khóa phân loại của de Hoog *et al.* (2000), các đặc điểm mô tả nêu trên đã định danh được 3 giống vi nấm gồm *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. và *Mucor* sp. Nghiên cứu lần đầu tiên phân lập được chủng *Mucor* sp.

nhễm trên cá. Kết quả tương tự Ke *et al.* (2010) cũng lần đầu phát hiện *Mucor cercinelloides* gây bệnh cá vàng ở Trung Quốc.

**3.3 Đặc điểm sinh học của vi nấm nhiễm trên cá tra giống**

**3.3.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự phát triển của vi nấm**

Các chủng vi nấm thí nghiệm đều có khả năng phát triển ở nhiệt độ 23 – 38 °C. Vi nấm phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 28 - 33°C. Ở 28°C đường kính trung bình khuẩn lạc của các chủng vi nấm từ 52,1 - 82,1 mm sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường GYA. *Fusarium* sp. không phát triển ở 38°C nhưng các chủng *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp., *Aspergillus* sp. và *Mucor* sp. vẫn phát triển với đường kính khuẩn lạc từ 11,5 – 16,4 mm (Bảng 1). Ngoài sự khác biệt về đường kính khuẩn lạc, hệ sợi nấm của các chủng vi nấm cũng có sự khác biệt ở các nhiệt độ khác nhau. Trong khoảng nhiệt độ thích hợp 28 - 33°C cho thấy hệ sợi vi nấm phát triển dày đặc, mọc nhô cao khỏi bề mặt môi trường, nhưng ở nhiệt độ 38°C sợi nấm rất thưa và phát triển sát bề mặt môi trường.

**Bảng 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự phát triển của vi nấm**

Nhiệt độ (°C)	Đường kính khuẩn lạc (mm)				
	<i>Saprolegnia</i> sp.	<i>Achlya</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
23	73,7 ± 0,3	72,4 ± 0,3	27,3 ± 0,2	33,4 ± 0,3	62,4 ± 0,4
28	80,5 ± 0,5	82,1 ± 0,5	52,1 ± 0,4	75,6 ± 0,4	78,9 ± 0,2
33	74,0 ± 0,2	75,3 ± 0,4	49,6 ± 0,2	41,2 ± 0,1	70,2 ± 0,3
38	15,6 ± 0,3	14,6 ± 0,6	11,5 ± 0,5	0	16,4 ± 0,3

Theo Nguyễn Thị Huyền (2006) cho rằng trong khoảng nhiệt độ 25- 30°C là nhiệt độ thích hợp cho nấm *Achlya* sp. gây bệnh trên trứng cá tra và cá basa. Nhiệt độ ức chế tạm thời là 10°C và nhiệt độ ức chế hoàn toàn khả năng phát triển của chủng *Achlya* sp là 45°C. Nhiệt độ 30-35°C là mức thích hợp cho vi nấm *A. bisexualis* nhiễm trên cá lóc giai đoạn giống (Nguyễn Thị Thúy Hằng, 2011). *Fusarium* sp. phân lập trên cá rô đồng *A. testudineus* nuôi thâm canh có khả năng phát triển trong khoảng nhiệt độ 20-35°C (Trần Ngọc Tuấn, 2010). Điều kiện nhiệt độ tối ưu để nuôi cấy *Aspergillus* sp. là 30°C (Đỗ Thụy Tuyên và *ctv.*, 2008). Tuy nhiên, theo Đào Thị Ngọc Ánh (2009) thì chủng *Aspergillus* sp. phát triển mạnh ở nhiệt độ 30-37°C. Báo cáo về các độc tố của nấm mốc trong thức ăn chăn nuôi cho thấy *Mucor* sp. phát triển ở nhiệt độ 15-30°C nhưng phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 25-30°C (Lương Quốc Hưng và *ctv.*, 2011). Như vậy, các chủng vi nấm nhiễm trên cá tra giống có thể tồn tại và phát triển ở nhiệt độ cao.

**3.3.2 Ảnh hưởng của độ mặn đến sự phát triển của vi nấm**

Độ mặn càng tăng thì các chủng vi nấm phát triển càng giảm. *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. và *Mucor* sp. có thể phát triển ở nồng độ NaCl từ 0-2 % nhưng *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. không phát triển ở 2% sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường GYA. Vi nấm phát triển tối ưu trong môi trường không có muối và đường kính trung bình khuẩn lạc các chủng 50,3 – 81,4 mm. Ở độ mặn 1,5% thì khuẩn lạc các chủng *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. phát triển chậm và giảm ½ so với trong môi trường không có NaCl (Bảng 2). Tương tự nhiệt độ, độ mặn cũng ảnh hưởng đến sự phát triển hệ sợi nấm, kết quả quan sát cho thấy hệ sợi nấm phát triển tốt nhất ở độ mặn 0%, sợi nấm phát triển nhanh, dày đặc, phát triển nhô cao khỏi bề mặt môi trường. Ở độ mặn 0,5 - 1,5% hệ sợi phát triển giảm dần, sợi nấm thưa và thấp.

**Bảng 2: Ảnh hưởng của độ mặn lên sự phát triển của vi nấm**

Độ mặn (%)	Đường kính khuẩn lạc (mm)				
	<i>Saprolegnia</i> sp.	<i>Achlya</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
0	80,7 ± 0,3	81,4 ± 0,5	50,3 ± 0,2	76,1 ± 0,2	78,4 ± 0,5
0,5	79,5 ± 0,7	80,1 ± 0,2	50,1 ± 0,3	76,6 ± 0,5	70,7 ± 0,2
1	44,0 ± 0,2	43,3 ± 0,4	39,6 ± 0,4	55,1 ± 0,2	59,2 ± 0,5
1,5	19,3 ± 0,5	21,6 ± 0,2	33,4 ± 0,2	32,6 ± 0,2	38,5 ± 0,2
2	0	0	29,2 ± 0,2	28,7 ± 0,4	8,8 ± 0,3

Kết quả của nghiên cứu tương tự với thí nghiệm ở nấm *A. bisexualis* nhiễm trên cá lóc có thể phát triển đến độ mặn 1% và bị ức chế hoàn toàn ở độ mặn 2% (Nguyễn Thị Thúy Hằng, 2011). Theo Abking *et al.* (2012) nấm *Achlya* spp. nhiễm trên trứng cá tra dầu (*P. gigas*) ở Thái Lan tăng trưởng tối ưu với nồng độ muối là 1,5% và không phát triển ở độ mặn 2-2,5 %. Nhưng *Fusarium* sp. nhiễm trên cá rô đồng có thể phát triển đến độ mặn 4% (Trần Ngọc Tuấn, 2010). Khảo sát ảnh hưởng của độ mặn lên khả năng sinh trưởng của chủng nấm *Aspergillus* sp ở nồng độ 0%, 2%, 3%, 5%, 7% và 10% cho kết quả nấm phát triển ở tất cả các nồng độ trên nhưng sinh trưởng tốt nhất ở độ mặn 3% (Võ Thị Bích Viên, 2009).

**3.3.3 Ảnh hưởng của pH đến sự phát triển của vi nấm**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng yếu tố pH lên sự phát triển của các chủng vi nấm cho thấy trong môi trường GY lỏng ở các giá trị pH từ 3-11 sau 5 ngày nuôi cấy có *Saprolegnia* sp. và *Achlya* sp. phát

triển, các nhóm vi nấm còn lại phát triển trong khoảng pH 4-9. Vi nấm phát triển tốt nhất trong khoảng pH 5-7. *Aspergillus* sp. và *Fusarium* sp. không phát triển trong môi trường có pH ≤ 3 và pH ≥ 10 (bảng 3).

Kết quả nghiên cứu của Kitancharoen và Hatai (1997) ở các giống *Saprolegnia*, *Aphanomyces* và *Achlya* cho thấy khoảng pH tối ưu cho nấm phát triển từ 5 –10. Nghiên cứu nấm *Achlya* sp. nhiễm trên cá rô phi tại Thái Lan cho thấy nấm sinh trưởng tốt và động bào tử có thể nảy mầm ở pH 4 – 11 và nấm phát triển tối ưu trong khoảng pH 6 –8 (Panchai *et al.*, 2014). *A. klebsiana* nhiễm trên cá chép có thể phát triển ở pH từ 6,0 –7,0 (Chukanhom and Hatai, 2004). Các chủng *Fusarium* sp. phân lập trên cá rô đồng bị “nấm nhớt” có khả năng phát triển trong điều kiện pH rộng (pH 4-11) (Trần Ngọc Tuấn và Phạm Minh Đức, 2010). Kết quả nghiên cứu các chủng vi nấm nhiễm trên cá tra tương tự các nghiên cứu trước đây và cũng cho thấy các chủng vi nấm có thể tồn tại trong các điều kiện môi trường khác nhau.

**Bảng 3: Ảnh hưởng của pH lên sự phát triển của vi nấm**

pH	Đường kính khuẩn lạc (mm)				
	<i>Saprolegnia</i> sp.	<i>Achlya</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
3	1	1	0	0	0
4	1	2	1	1	2
5	3	3	3	3	3
6	3	3	3	3	3
7	3	3	3	3	3
8	3	3	2	2	2
9	2	2	1	1	1
10	1	1	0	0	1
11	1	1	0	0	1

3: vi nấm phát triển nhiều; 2: vi nấm phát triển vừa; 1: vi nấm ít và 0: vi nấm không phát triển

**3.3.4 Khả năng sử dụng carbohydrate của vi nấm**

Kết quả cho thấy các chủng vi nấm *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Achlya* sp. và *Saprolegnia* sp. đều có khả năng sử dụng glucose, sucrose và maltose trong quá trình phát triển (Bảng

4). Kết quả thí nghiệm cũng tương tự nghiên cứu của Morkunas *et al.* (2010) khi nuôi cấy *Fusarium* sp. trong môi trường có sucrose sau 96 giờ sau đó sử dụng RT-PCR để đánh giá khả năng sinh tổng hợp gen thì xác định là có sử dụng sucrose. Ngoài



ra, Sorensen và Giese (2013) cho thấy *Fusarium* sp. sử dụng sucrose và maltose cho việc chuyển hóa thứ cấp các hoạt tính sinh học. Trong nghiên cứu sự phát triển của nấm *Aspergillus niger* ở môi trường nuôi cấy với nguồn carbon và nitơ khác nhau cho kết quả khi bổ sung maltose với

AlPO<sub>4</sub> và sucrose với CaHPO<sub>4</sub> làm cho vi nấm phát triển lớn nhất (Barroso *et al.*, 2006). Maltose và sucrose được cung cấp vào môi trường thạch thì các loại nấm nghiên cứu tăng trưởng tốt hơn đáng kể, trong đó *Mucor* sp. và *Rhizopus* sp. tăng trưởng tốt nhất (Laleye *et al.*, 2007).

**Bảng 4: Khả năng sử dụng carbohydrate của vi nấm**

Carbohydrate	<i>Saprolegnia</i> sp.	<i>Achlya</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
Glucose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+

(+): dương tính. (-): âm tính.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

##### 4.1 Kết luận

Cá tra giống nhiễm vi nấm *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. và *Mucor* sp. Mang, cơ, gan và bóng hơi nhiễm *Fusarium* sp. và *Aspergillus* sp. nhưng *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp. và *Mucor* sp. nhiễm ở mang và cơ. Vi nấm phát triển tốt ở 28-33°C, pH 5-8, độ mặn 1,5% và sử dụng glucose, sucrose và maltose.

##### 4.2 Đề xuất

Thử nghiệm khả năng gây bệnh của các giống vi nấm nhiễm trên cá tra giống.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abking, N., W. Fuangsawat and O. Lawhanivit, 2012. Pathogenicity to Mekong giant catfish eggs of water moulds isolated in the laboratory from Mekong giant catfish eggs and rearing water. *Kasetsart Journal* 46:91-97.

Barroso, C.B., G.T. Pereira and E. Nahas, 2006. Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology* 37(4): 434-438.

Bly, J.E., L.A. Lawson, D.J. Dale, A.J. Szalai, R.M. Durborow and L.W. Clem, 1992. Winter saprolegniasis in channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms* 13: 155-164.

Bruno, D.W. and B.P. Woo, 1994. *Saprolegnia* and other *Oomycetes*. *Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal* 599-659.

Chauhan, R., 2012. Study on certain fungal diseases in culturable and non-culturable species of fishes of Upper Lake, Bhopal. *J. Chemis. Biol. Phys. Sci.* 4(2): 1810-1815.

Chauhan, R., 2014. Studies on some fresh water fishes found infected with dermatomycoses, collected from different water bodies in and around Bhopal, India. *IndoAmerican Journal of Pharmaceutical Research* 4(3):1591-1596.

Chukanhom, K. and K. Hatai, 2004. Freshwater fungi isolated from eggs of the common carp *Cyprinus carpio* in Thailand. *Mycoscience* 45: 42-48.

Coker, W.C., 1923. The Saprolegniaceae with notes on the other water mold. University of North California Press.

Đào Thị Ngọc Ánh, 2009. Nghiên cứu phân loại, khả năng phân hủy ddt và sinh laccase của chủng nấm sợi phân lập từ đất ô nhiễm hỗn hợp thuốc trừ sâu. Luận văn thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Thái Nguyên.

De Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gené and M.J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor schimmelculture. 1126p.

Đỗ Thụy Tuyên, Nguyễn Lê Sỹ Thanh và Quyên Đình Thị, 2008. Tối ưu một số điều kiện nuôi cấy chủng nấm *Aspergillus oryzae* DSM1863 và *Aspergillus niger* DSM1957 sinh tổng hợp Xylanase. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(3). 349-355.

Gams, W., H.A. van der Aa, A.J. van der Plaats-Niterink, R.A. Samson and J.A. Stalpers, 1980. CBS course of mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn (The Netherlands), Institute of the Royal Netherlands, Academy of Science and Letters, Amsterdam-Zuid. 109pp.

Hatai, K. and G.I Hoshiai, 1994. Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* Coker. In: *Saloon saprolegniasis*. 87-98.

Hatai, K. and S. Egusa, 1978. Studies on the pathogenic fungus associated with black gill disease of kuruma prawn *Penaeus japonicus*

- II: some of the note on the BG-Fusarium. Fish pathology 12: 225-231.
- Hatai, K., S.S. Kubota, N. Kida and S. Udagawa, 1986. *Fusarium oxysporum* in Red Sea Bream (*Pagrus* sp.). Journal of Wildlife Diseases 22(4): 570-571.
- Iqbal, Z. and S. Saleemi, 2013. Isolation of pathogenic fungi from a freshwater commercial fish, Catla catla (Hamilton). Sci.Int. 25(4):851-855.
- Ke, X., J. Wang, M. Li, Z. Gu and X. Gong, 2010. First report of *Mucor circinelloides* occurring on yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) from China. FEMS Microbiology Letters 302(2):144-150.
- Khoa, L. V. and K. Hatai, 2005. First case of *Fusarium oxysporum* infection in culture Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* in Japan. Fish Pathology 40: 195-196.
- Kitancharoen, N., K. Hatai and A. Yamamoto, 1997. Aquatic fungi developing on eggs of salmonids. Journal of aquatic animal health 9:314-316.
- Kitancharoen, N. and K. Hatai, 1998. Some biochemical characteristics of fungi isolate from salmonid eggs. Mycoscience 39: 249-255.
- Koeypudsa, W., P. Phadee, J. Tangtrongpiros and K. Hatai, 2005. Influence of pH, temperature and sodium chloride concentration on growth rate of *Saprolegnia* sp. J. Sci. Res. Chula. Univ 30(2): 123-130.
- Laleye S.A., P. O. Tedela, B. Adesua, O. Famurewa, 2007. Growth of Some Microorganisms on Media Formulated from Local Raw Materials. Research Journal of Microbiology 2: 545-549.
- Lương Quốc Hưng, 2011. Các độc tố của nấm mốc trong thức ăn chăn nuôi, Khoa Thú Y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Morkunas, I., D. Narożna, W. Nowak, S. Samardakiewicz and D. Remlein-Starosta, 2010. Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. Journal of Plant Physiology 168(5):424-33.
- Nguyễn Thị Huyền, 2006. Xác định nấm thủy mi nhiễm trên trứng cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá basa (*Pangasius bocourti*) – thử nghiệm hiệu quả phòng.
- Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Trường Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Thị Thúy Hằng, 2011. Phân lập và định danh vi nấm ký sinh trên cá lóc (*Channa striata*) giai đoạn giống. Luận văn cao học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Panchai, K., C. Hanjavanit, N. Rujinanont, S. Wada, O. Kurata, K.Hatai, 2014. Freshwater oomycete isolated from net cage cultures of *Oreochromis niloticus* with water mold infection in the Nam Phong River, Khon Kaen Province, Thailand. AACL Bloflux 7(6): 529-542.
- Phạm Minh Đức, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên và Đặng Thụy Mai Thy, 2013. Nghiên cứu vi nấm bậc cao *Fusarium* sp. nhiễm trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thương phẩm. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn 15: 74-79.
- Phạm Minh Đức, Trần Ngọc Tuấn và Trần Thị Thanh Hiền, 2012. Khảo sát mầm bệnh trên cá lóc (*Channa striata*) nuôi ao thâm canh ở An Giang và Đồng Tháp. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ 21b: 124-132.
- Rhoobunjongde, W., K. Hatai, S. Wada, S.S. Kubota, 1991. *Fusarium moniliforme* (Sheldon) isolated from gills of kuruma prawn *Penaeus japonicus* (Bate) with black gill disease. Nippon Suisan Gakkaishi 57:629-635.
- Sorensen, J. L. and H. Giese, 2013. Influence of Carbohydrates on Secondary Metabolism in *Fusarium avenaceum*. Toxins 5(9): 1655-1663.
- Trần Ngọc Tuấn và Phạm Minh Đức, 2010. Đặc điểm hình thái và sinh học của một số giống nấm phân lập trên cá rô đồng *Anabas testudineus* bị bệnh “nấm nhớt”. Tạp chí khoa học Đại học Cần thơ 14b:224-231.
- Trần Ngọc Tuấn, 2010. Phân lập và định danh vi nấm ký sinh trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nuôi thâm canh. Luận văn cao học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Võ Thị Bích Viên, 2009. Khảo sát đặc điểm sinh học một số chủng nấm sợi thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium* từ rừng ngập mặn Cần Giờ Tp. Hồ Chí Minh. Luận văn thạc sĩ Khoa học sinh học, Trường Đại học sư phạm Tp. Hồ Chí Minh.
- Zahura, U.A., M.B.R. Chowdhury and M.A.R. Faruk, 2004. Fungal infection in freshwater fishes of Mymensingh Bangladesh. Indian Journal of Fish 51(1):61-68.