

# TỔNG QUAN BỆNH NẤM Ở ĐỘNG VẬT THỦY SẢN

Phạm Minh Đức<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Phương<sup>1</sup> và Trần Ngọc Tuấn<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Fungi are popular pathogen in aquatic animals. The aims of this study are to systematize fungal diseases in aquatic animals, to summarize the results of previous studies included isolation, culture and identification in order to apply knowledge for fungal diseases study. There are two groups of fungi that common infected on aquatic animals. The lower fungi have hyphae without septate for examples Saprolegnia, Achlya, Aphanomyces, Branchiomyces, Lagenidium and Haliphthoros and the higher fungi have hyphae with septate included Fusarium, Exophiala, Ochroconis, Acremonium and Plectosporium. Methodology of fungal study for sample collection, wet-mount observation, isolation, single conidium culture, slide culture, asexual reproduction, and identification are described in this paper.*

**Keywords:** *Fungal diseases, quatic animals, isolation, identification*

**Title:** *Overview fungal diseases in aquatic animals*

## TÓM TẮT

*Nấm là một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến ở động vật thủy sản. Mục tiêu của bài tổng hợp này là hệ thống lại bệnh nấm ở động vật thủy sản, đúc kết phương pháp nghiên cứu về bệnh nấm như phân lập, nuôi cấy và định danh nhằm cung cấp kiến thức cần thiết cho nghiên cứu bệnh thủy sản. Nấm gây bệnh ở động vật thủy sản gồm 2 nhóm đó là nấm bậc thấp chủ yếu nấm thủy mi như Saprolegnia, Achlya, Aphanomyces và một số giống khác như Branchiomyces, Lagenidium, Haliphthoros và nấm bậc cao chủ yếu nấm bất toàn như Fusarium, Exophiala, Ochroconis, Acremonium và Plectosporium. Phương pháp nghiên cứu nấm như thu và vận chuyển mẫu, quan sát tiêu bản tươi, phân lập, nuôi cấy đơn bào tử, nuôi cấy trên lame kính, nuôi cấy nấm bậc thấp sinh sản vô tính và khóa định danh một số giống nấm thường gây bệnh ở động vật thủy sản được tổng hợp trong bài tổng quan này.*

**Từ khóa:** *Bệnh nấm, động vật thủy sản, phân lập, định danh*

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh ở động vật thủy sản do nhiều tác nhân gây ra như vi rút, vi khuẩn, ký sinh trùng và nấm. Tuy nhiên, trong bài viết này chủ yếu đề cập đến bệnh do nấm gây ra. Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh nấm ở động vật thủy sản như một số loài nấm bất toàn thuộc các giống như *Fusarium*, *Acremonium*, *Plectosporium*, *Ochroconis*, *Phoma* và *Exophiala* và nhóm nấm thủy mi như *Saprolegnia*, *Achlya*, *Leptolegnia* và *Aphanomyces* là tác nhân gây bệnh ở động vật thủy sản (Ishikawa, 1968; Egusa and Ueda, 1972; Lightner and Fontaine, 1975; Hatai and Egusa, 1978; Alderman and Polglase, 1985; Hatai *et al.*, 1986a; Hatai *et al.*, 1986b; Momoyama, 1987; Hatai and Kubota, 1989; Kitancharoen *et al.*, 1995; Kitancharoen *et al.*, 1997; Hussein and Hatai, 1999; Diler and Bolat, 2001;

<sup>1</sup> Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> TTUD&CGCNTS, Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ

Chukanhom and Hatai, 2004; Khoa *et al.*, 2004; Khoa *et al.*, 2005; Khoa and Hatai, 2005; Munchan *et al.*, 2006; Munchan *et al.*, 2009; Duc *et al.*, 2009; Duc and Hatai, 2009; Duc, 2009). Nghiên cứu về cảm nhiễm, ảnh hưởng của nhiệt độ, độ mặn, pH và môi trường nuôi cấy lên quá trình phát triển của nấm đã thực hiện (Roza and Hatai, 1999; Hussein and Hatai, 2002; Duc *et al.*, 2009; Duc and Hatai, 2009; Duc, 2009). Tuy nhiên, những tài liệu và nghiên cứu về bệnh nấm trên động vật thủy sản ở Việt Nam còn rất hạn chế. Chính vì vậy, mục tiêu của bài tổng quan này nhằm hệ thống một số bệnh nấm thường gặp ở động vật thủy sản, đúc kết phương pháp nghiên cứu về bệnh nấm như phân lập, nuôi cấy và định danh nấm nhằm cung cấp kiến thức cần thiết và quan trọng cho lĩnh vực bệnh thủy sản.

## 2 MỘT SỐ BỆNH NẤM THƯỜNG GẶP Ở ĐỘNG VẬT THỦY SẢN

### 2.1 Nhóm nấm bậc thấp

*Khái niệm về nấm bậc thấp*: đặc điểm cơ bản để nhận biết nấm bậc thấp là sợi nấm không có vách ngăn ngang (de Hoog *et al.*, 2000).

*Bệnh nấm thủy mi*: tác nhân chủ yếu gồm các giống *Saprolegnia*, *Aphanomyces* và *Achlya* (Yanong, 2003). Nấm có dạng sợi, cấu tạo các sợi nấm đa bào và không có vách ngăn ngang. Các sợi nấm dày và bện vào nhau trông giống như túi bông gòn bên ngoài cơ thể vật chủ, chúng có khả năng sinh sản vô tính và hữu tính (Neish and Hughes, 1980). Nấm *Saprolegnia* là tác nhân cơ hội gây bệnh ở cá chép *Cyprinus carpio*, cá lóc *Chanos chanos* và cá *Odonthetes bonariensis* ở Nhật Bản (Kitancharoen *et al.*, 1995). Loài *S. diclina* nhiễm ở trứng cá hồi *Oncorhynchus mykiss* ở Nhật Bản (Kitancharoen *et al.*, 1997), trứng cá chép ở Thái Lan (Chukanhom and Hatai, 2004) và *S. salmonis* sp. nov. nhiễm ở cá hồi *O. nerka* (Hussein and Hatai, 1999; Hussein and Hatai, 2002). Nấm *Aphanomyces* khi nuôi cấy trên môi trường thạch GYA khuẩn lạc có màu trắng. Sợi nấm phân nhánh và không có vách ngăn ngang, đường kính 7-15  $\mu\text{m}$ . Động bào tử sơ cấp hình cầu 10-15  $\mu\text{m}$  và tập trung tại đầu mút túi bào tử, động bào tử thứ cấp dạng quả thận với hai tiên mao. Túi noãn hình quả lê hoặc hình cầu với đường kính 16-25  $\mu\text{m}$ , mỗi túi noãn chứa một noãn bào tử hình cầu đường kính 14-22  $\mu\text{m}$  thường lệch tâm với các hạt nhỏ sáng bao quanh (Sinmuk *et al.*, 1996; Kitancharoen and Hatai, 1997). Nấm *Aphanomyces* nhiễm trên trứng cá hồi chấm *Salvelinus leucomaenis*, cá hồi *O. masou*, cá ayu *Plecoglossus altivelis*, cá chẽm *Lates calcarifer*, cá sặc *Trichogaster trichopterus* và ở tôm nước ngọt như *Procambarus clarkii* và *Pacifastacus leniusculus* (Kitancharoen and Hatai, 1997; Yanong, 2003, Royo *et al.*, 2004). Nhiệt độ tối ưu cho nấm phát triển là 20-25°C và pH 5-10 (Kitancharoen and Hatai, 1997). Loài *Achlya bisexualis* nhiễm ở cá rô phi *Oreochromis niloticus* (Panchai *et al.*, 2007) và *A. klebsiana* nhiễm ở trứng cá chép (Chukanhom and Hatai, 2004).

*Bệnh nấm mang*: tác nhân gây bệnh chủ yếu là *Branchiomyces*. Sợi nấm phân nhánh, đường kính 19-21  $\mu\text{m}$ . Nấm thường ký sinh ở mang, dấu hiệu nhận biết là mang chuyển sang màu hồng nhạt hoặc màu trắng đục, các tơ mang dính lại hoặc sưng to, hoại tử, quan sát tiêu bản tươi thấy sợi nấm có màu nâu sáng, phân nhánh và không có bào tử (Neish and Hughes, 1980; Yanong, 2003). *Branchiomyces*

nhiễm trên cá hồi *O. mykiss*, cá hồi cẩm thạch *Salmon trutta*, cá chó *Esox lucius*, cá chép, cá *Perca fluviatilis*, cá chình *Anguilla rostrata*, *A. anguilla* và *A. japonica* (Khoo *et al.*, 1998; Paperna and Cave, 2001; Yanong, 2003).

**Bệnh do nấm *Lagenidium*:** nấm khi nuôi cấy trên môi trường PYGSA khuẩn lạc có màu trắng và đường kính 35-40 mm sau 5 ngày, ở 25°C. Sợi nấm không vách ngăn và không phân nhánh, có nhiều hạt nhỏ bên trong, đường kính 5-40 µm. Động bào tử được hình thành trong túi bào tử sau 12 giờ khi chuyển sang cấy trong môi trường nước biển nhân tạo. Động bào tử có kích cỡ 5-15 x 5-16 µm, hình quả lê với hai tiên mao (Nakamura *et al.*, 1995; Hatai *et al.*, 2000). Dấu hiệu nhận biết là xuất hiện đốm trắng bên ngoài vật chủ, đồng thời quan sát tiêu bản tươi cho thấy có sự hiện diện của sợi nấm. Tỷ lệ gây chết do nấm *Lagenidium* trên ấu trùng của cá có thể lên đến 100% (Nakamura *et al.*, 1994; Roza and Hatai, 1999; Hatai *et al.*, 2000). Loài *L. callinectes* gây bệnh ở giai đoạn trứng và ấu trùng ghẹ xanh *Callinectes sapidus* và *Portunus pelagicus*, ở ấu trùng của biển *Scylla serrata* và ở tôm biển *Pandalus hypsinotus* (Nakamura *et al.*, 1994; Nakamura and Hatai, 1995; Hatai *et al.*, 2000). Loài nấm khác là *L. thermophilum* nhiễm ở giai đoạn trứng và ấu trùng của biển và tôm sú và *L. myophilum* nhiễm ở tôm *Pandalus hypsinotus*. Nhiệt độ tối ưu cho nấm phát triển tốt là 25°C và độ mặn khoảng 0-50‰ (Nakamura *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1995; Nakamura and Hatai, 1995; Hatai *et al.*, 2000; Muraosa *et al.*, 2006).

**Bệnh do nấm *Haliphthoros*:** nấm khi nuôi cấy trên môi trường PYGSA khuẩn lạc có màu trắng và đường kính 20-25 mm sau 5 ngày ở 25°C. Sợi nấm có nhiều hạt nhỏ sáng bên trong, không có vách ngăn, nhưng phân nhánh, đường kính 7.5-30 µm. Sợi nấm có điểm mấu tạo thành túi bào tử. Động bào tử có kích thước 6.5 x 8.5 µm, hình quả thận hay đế giày với hai tiên mao ở hai đầu (Hatai *et al.*, 2000). Loài nấm *H. milfordensis* và *H. philippinensis* nhiễm ở hàu *Urosalpinx cinerea*, tôm hùm *Homarus americanus*, bào ngư *Haliotis sieboldii*, ấu trùng của *S. serrata*, ghẹ *P. pelagicus* và tôm he *P. japonicas*. Nhiệt độ tối ưu cho nấm phát triển từ 25-30°C, pH 4-11 và độ mặn khoảng 10-50‰. (Hatai *et al.*, 1992; Nakamura and Hatai, 1995; Hatai *et al.*, 2000; Chukanhom *et al.*, 2003).

## 2.2 Nhóm nấm bậc cao

**Khái niệm về nấm bậc cao:** đặc điểm cơ bản để nhận biết nấm bậc cao là sợi nấm có vách ngăn ngang (de Hoog *et al.*, 2000).

**Bệnh do nấm *Fusarium*:** một số loài như *Fusarium solani*, *F. moniliforme* và *F. oxysporum* là tác nhân gây bệnh đen mang ở tôm he *P. japonicus* (Egusa and Ueda, 1972; Bian and Egusa, 1981; Khoa and Hatai, 2005). Tác nhân gây bệnh đen mang ở tôm sú *P. monodon* và trên tôm hùm *Homarus americanus* do nấm *F. incarnatum* (Lightner and Fontain, 1975; Khoa *et al.*, 2004). Ngoài ra, nấm *F. solani* nhiễm trên rùa biển *Caretta caretta* (Hose *et al.*, 1984; Cabanes *et al.*, 1997) và nấm *Fusarium* sp. nhiễm trên tôm càng xanh (Burns *et al.*, 1979).

**Bệnh do nấm *Acremonium*:** nấm *Acremonium* khuẩn lạc phát triển nhanh trên môi trường PYGSA, đường kính khoảng 70 mm sau 10 ngày ở 20°C, khuẩn lạc có màu hơi trắng, vàng nhạt hoặc hơi hồng. Sợi nấm tập trung thành chùm. Cuống sinh bào tử là thể bình dạng búp măng. Bào tử thường là một tế bào, hình cầu hoặc trụ,

thẳng hoặc cong, vách nhẵn và mỏng, kích thước 4-10 x 2.5-3  $\mu\text{m}$ , thường tập trung ở đầu mút của cuống sinh bào tử. Thể bình có vách ngăn ở phần gốc và giống như viên cổ áo ở đầu mút. Bào tử vách dày thường hiện diện. Nhiệt độ thích hợp cho nấm phát triển từ 20-30°C và pH khoảng 4-11 (de Hoog *et al.*, 2000; Duc *et al.*, 2009). Nấm *Acremonium* sp. là tác nhân gây bệnh đen mang ở tôm *Astacus leptodactylus* (Diler and Bolat, 2001), nâu mang ở tôm tít *Oratosquilla oratoria* và có khả năng gây bệnh cho tôm he *P. japonicus* trong điều kiện thí nghiệm (Duc *et al.*, 2009; Duc, 2009).

**Bệnh do nấm *Plectosporium*:** nấm *Plectosporium* khuẩn lạc phát triển rất chậm trên môi trường PYGSA, đường kính 10-13 mm sau 14 ngày ủ ở 25°C, bề mặt nhẵn có màu trắng đục hoặc hơi vàng. Sợi nấm phân nhánh, có vách ngăn đường kính 1-4  $\mu\text{m}$ . Cuống sinh bào tử dạng thể bình không phân nhánh, có vách ngăn ở phần gốc. Bào tử dạng ellip, trụ hơi cong, có 0, 1, hoặc 3 vách ngăn, đường kính 12-16 x 3-4  $\mu\text{m}$  (de Hoog *et al.*, 2000; Duc *et al.*, 2009). Loài *Plectosporium oratosquillae* trên môi trường PYGSA, khuẩn lạc 9-17 mm sau 15 ngày ở 25°C, có nguồn gốc từ nước mặn vì chúng phát triển tốt ở môi trường có 100% nước biển và không phát triển trong môi trường nước ngọt (Duc *et al.*, 2009). Nấm *P. oratosquillae* là tác nhân gây bệnh nâu mang ở tôm tít *O. oratoria* và loài này có khả năng gây bệnh đen mang ở tôm he *P. japonicus* trong điều kiện thí nghiệm (Duc, 2009).

### 3 PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP NẤM

#### 3.1 Thu và vận chuyển mẫu (Yuasa *et al.*, 2002)

Thu mẫu động vật thủy sản có dấu hiệu bệnh lý khoảng 5-15 cá thể, vận chuyển mẫu sống có sục khí hoặc mẫu được giữ lạnh trong thùng mát, rồi chuyển nhanh về phòng thí nghiệm để chẩn đoán và phân lập nấm. Nếu không thể chuyển mẫu về phòng thí nghiệm trong ngày thì tiến hành thu mẫu như sau: cắt bệnh phẩm (5  $\text{mm}^3$ ) cho vào nước cất vô trùng có 500  $\mu\text{g/ml}$  mỗi loại kháng sinh streptomycin và ampicillin, giữ ở nhiệt độ thường, rồi đưa về phòng thí nghiệm phân lập nấm.

#### 3.2 Quan sát tiêu bản tươi (Gam *et al.*, 1980; Hatai *et al.*, 2000)

Nấm thường ký sinh ở mang đối với tôm và da, cơ, mang và nội quan đối với cá. Khi quan sát bằng mắt thường phát hiện có dấu hiệu bất thường như mang tôm chuyển sang màu nâu hoặc đen, thân cá xuất hiện những túi màu trắng giống như bông gòn hoặc nội quan như gan bị tụ huyết hay sưng tấy thì tiến hành quan sát tiêu bản tươi. Phương pháp làm tiêu bản tươi như sau: cắt một phần bệnh phẩm đưa lên lam kính, nhỏ 1 giọt nước muối sinh lý vô trùng, đặt lam lên, quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại x200 hoặc x400 nhằm xác định có sự hiện diện của sợi nấm hay bào tử nấm. Cách khác thay giọt nước muối sinh lý bằng giọt thuốc nhuộm *cotton blue*, quan sát dưới kính hiển vi giống như trên. Thuốc nhuộm *cotton blue* gồm 0,05 g *cotton blue* (aniline blue), 20 g phenol crystals ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4$ ), 40 ml glycerol, 20 ml axit lactic ( $\text{CH}_3\text{CHOH-COOH}$ ) và 20 ml nước cất (de Hoog *et al.*, 2000). Cách pha chế như sau: (b1) hòa tan *cotton blue* trong nước cất để 24 giờ; (b2) cho phenol crystal vào axit lactic khuấy đều sau đó cho glycerol vào; (b3) lọc dung dịch *cotton blue* cho vào hỗn hợp (b2) và bảo quản ở nhiệt độ 15-20°C.

### 3.3 Phương pháp phân lập nấm (Hatai *et al.*, 2000)

Sau khi quan sát tiêu bản tươi thấy có sự hiện diện của sợi nấm hay bào tử nấm thì tiến hành phân lập. Phương pháp phân lập nấm được thực hiện như sau: cắt phần nhỏ mẫu bệnh phẩm, rửa qua nước muối sinh lý vô trùng 3 lần, sau đó cấy trên môi trường Pepton Yeast-extract Glucose Salt Agar (PYGSA: gồm 1,25 g pepton; 1,25 g yeast extract; 3 g glucose; 30 g muối; 15 g agar và 1000 ml nước cất) đối với nấm gây bệnh ở nước lợ, mặn hoặc môi trường Glucose Yeast-extract Agar (GYA: gồm 10g glucose; 1,25g yeast extract; 15g agar và 1000 ml nước cất) đối với nấm gây bệnh ở nước ngọt. Sau đó rắc một ít mỗi loại kháng sinh ampicillin và streptomycin xung quanh mẫu bệnh phẩm đã cấy trên môi trường trên để hạn chế và diệt vi khuẩn. Ủ ở 25-30°C cho nấm phát triển từ 1-4 ngày tùy theo loài (chú ý trong thời gian ủ, thường xuyên quan sát sự phát triển của nấm), khi nấm phát triển thì cấy truyền sang môi trường nuôi cấy mới, tiếp tục phương pháp cấy truyền 3 lần để có chủng nấm thuần cho những nghiên cứu tiếp theo. Ngoài ra, đối với nấm *Fusarium* thường được phân lập trên môi trường đặc trưng Potato Dextrose Agar (PDA) là môi trường hỗn hợp, gồm 39 g cho 1000 ml nước cất. Môi trường Synthetic Nutrient Agar (SNA) là môi trường dinh dưỡng nhân tạo, gồm 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1g KNO<sub>3</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g KCL; 0,2 g glucose; 0,2 g saccharose; 20 g agar và 1000 ml nước cất, đây là môi trường trong suốt nhằm để quan sát quá trình sinh sản vô tính của *Fusarium*.

## 4 PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

### 4.1 Phương pháp nuôi cấy đơn bào tử (Ho and Ko, 1997)

Phương pháp này chỉ áp dụng cho nấm bậc cao, mục đích là tạo được chủng nấm thuần từ nuôi cấy đơn bào tử. Các bước thực hiện như sau: (b1) đánh dấu mặt sau đĩa Petri (có môi trường nuôi cấy như PYGSA, PDA) bằng các vòng tròn (50 vòng/đĩa) có đường kính 0,5 cm; (b2) dùng pipet lấy 0,1 µl dung dịch bào tử (dung dịch bào tử được pha loãng trong nước muối sinh lý đến nồng độ 10 bào tử/µl) nhỏ vào giữa vòng tròn của đĩa Petri trên; (b3) ủ ở nhiệt độ 25-30°C khoảng 12-24 giờ, quan sát bào tử nảy mầm trong mỗi vòng tròn bằng kính hiển vi đảo chiều; (b4) chọn những vòng tròn chỉ có 1 bào tử nảy mầm rồi cấy truyền sang đĩa Petri có môi trường nuôi cấy mới để có được nấm thuần chủng.

### 4.2 Phương pháp nuôi cấy thu bào tử (Hatai and Egusa, 1972; Duc, 2009)

Phương pháp này áp dụng cho nấm bậc cao, vì nấm khi cấy trên môi trường thạch sẽ sinh sản vô tính nên có nhiều bào tử được sinh ra. Các bước thực hiện như sau: (b1) nuôi cấy để nấm sinh bào tử: nấm thuần được cấy trong môi trường thích hợp như PYGSA hay PDA, ủ ở nhiệt độ 25-30°C, thời gian từ 10-30 ngày; (b2) thu bào tử: cho 10 ml nước muối sinh lý (0,85% NaCl) vào đĩa Petri có nấm ở b1, dùng que cấy tách rời bào tử từ sợi nấm; (b3) dung dịch sợi nấm được lọc qua gạc y khoa tiệt trùng để thu bào tử nấm.

### 4.3 Phương pháp nuôi cấy nấm sinh sản vô tính

Đây là phương pháp quan trọng để theo dõi và quan sát đặc điểm sinh sản vô tính của nấm, ghi nhận hình ảnh để áp dụng trong khóa định danh nấm.

**4.3.1 Phương pháp cấy trên lame kính (de Hoog et al., 2000)**

Phương pháp này sử dụng phổ biến cho nấm bậc cao nhằm ghi nhận và mô tả đặc điểm hình thái của nấm trong quá trình sinh sản vô tính để định danh chúng. Phương pháp cấy trên lame kính gồm các bước sau: (b1) chuẩn bị dụng cụ vô trùng: gồm đĩa Petri, lame và lamen, que thủy tinh hình chữ V, giấy thấm và môi trường nuôi cấy như PYGSA hoặc PDA và nước nuôi sinh lý (0,85% NaCl); (b2) tạo khối môi trường agar: dùng dao cắt một khối môi trường agar (1x1x1 cm), đặt lên lame kính. Lame này để trên que thủy tinh hình chữ V, bên dưới có lớp giấy thấm (để giữ độ ẩm), tất cả đặt trong đĩa Petri; (b3) cấy nấm: cắt nấm thuần cấy vào 4 mặt bên của khối môi trường agar, rồi đặt lamen lên khối agar này; (b4) ủ nấm: ở nhiệt độ 20-30°C, cho đến khi quan sát thấy nấm phát triển khoảng 1–2 tuần; (b5) nhuộm và quan sát hình thái sinh sản vô tính: lấy lamen và lame kính ra, đặt lên lame kính mới có sẵn giọt thuốc nhuộm cotton blue hay thuốc nhuộm huỳnh quang, cố định bằng keo để 24 giờ, quan sát dưới kính hiển vi ghi nhận kết quả và chụp hình.

**4.3.2 Phương pháp nuôi cấy nấm bậc thấp sinh sản vô tính (Gam et al., 1980; Hussein and Hatai, 2002)**

Phương pháp này sử dụng cho nấm bậc thấp nhằm theo dõi, quan sát phương thức sinh sản vô tính và hữu tính để định danh chúng. Phương pháp này được thực hiện như sau: (b1) chuẩn bị dụng cụ vô trùng: gồm đĩa Petri, môi trường lỏng GY (1% glucose và 0.25% yeast-extract), môi trường thạch GYA, môi trường nước vôi và hạt mè; (b2) tạo sinh khối nấm: cắt 2-3 khối agar nấm (5 mm<sup>2</sup>) trong môi trường thạch GYA cấy vào môi trường lỏng GY, ủ 25-30°C khoảng 4-7 ngày (chờ đến khi khuẩn ty phát triển nhiều); (b3) cắt 2-3 khối sợi nấm trong môi trường lỏng GY, rửa 3 lần qua nước vôi vô trùng, sau đó cấy vào đĩa Petri có nước vôi vô trùng (25 ml/đĩa), ủ ở 25-30°C khoảng 18 giờ; (b4) quan sát hình thái sinh sản vô tính: sau thời gian ủ 18 giờ theo dõi liên tục quá trình sinh sản bằng kính hiển vi đảo chiều ghi nhận kết quả và chụp hình; (b5) quan sát hình thái sinh sản hữu tính: cho một ít hạt mè vô trùng vào đĩa Petri có chứa nước vôi và nấm, tiếp tục ủ ở 25-30°C khoảng 1 tháng để theo dõi quá trình phát triển túi noãn.

**5 PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH DANH**

**5.1 Phương pháp định danh nấm bậc thấp (Coker, 1923)**

Phương pháp định danh nấm bậc thấp căn cứ vào đặc điểm hình thái sinh sản vô tính và hữu tính. Bài viết này chủ yếu giới thiệu khóa phân loại họ Saprolegniaceae vì chúng thường gây bệnh trên động vật thủy sản và khóa phân loại này được sử dụng phổ biến. Coker (1923) mô tả khóa phân loại như sau:

- 1 Cuống sinh động bào tử nhỏ hoặc không có, vách của túi noãn có lỗ, giao tử đục phát triển ngay bên dưới và hướng về các bên của túi noãn .....*Aplanes*
- 1 Không có những đặc điểm trên ..... 2
- 2 Động bào tử được sinh ra từ đầu mút của túi bào tử ..... 3
- 2 Động bào tử được sinh ra từ vị trí khác của túi bào tử ..... 8
- 3 Động bào tử vận động sau khi được sinh ra từ túi bào tử ..... 4
- 3 Động bào tử tập trung tại đầu mút của túi bào tử..... 7

3 Động bào tử tạo thành bào tử nghỉ, túi bào tử hình tròn ..... *Protoachlya*  
 4 Túi bào tử nhỏ hơn sợi nấm, động bào tử xếp theo hàng đơn..... *Leptolegnia*  
 4 Túi bào tử lớn hơn sợi nấm, động bào tử không theo hàng .....5  
 5 Túi bào tử mới được hình thành từ túi bào tử cũ ..... *Saprolegnia*  
 5 Túi bào tử hình thành do quá trình phân nhánh sinh sản .....6  
 6 Giao tử đực trên túi noãn, lưỡng tính.....*Pythiopsis*  
 6 Không hoặc có ít giao tử đực, giao tử đực và cái trên cùng nhánh..... *Isoachlya*  
 7 Túi bào tử lớn hơn sợi nấm, động bào tử không theo hàng ..... *Achlya*  
 7 Túi bào tử nhỏ hơn sợi nấm, động bào tử theo đường thẳng ..... *Aphanomyces*  
 8 Bào tử nghỉ (encyst) hình thành trong túi bào tử .....*Dictyuchus*  
 8 Động bào tử sinh ra tự do khi vách túi bào tử vỡ ra ..... *Thraustotheca*

**5.2 Phương pháp định danh nấm bậc cao (de Hoog et al., 2000)**

Phương pháp định danh nấm bậc cao căn cứ vào hình thái sinh sản vô tính. Trong bài viết này chủ yếu đề cập đến nấm *Fusarium* vì thường gây bệnh ở động vật thủy sản. Khóa phân loại nấm *Fusarium* theo de Hoog et al. (2000) được sử dụng phổ biến và mô tả chi tiết như sau: đặc điểm cơ bản của *Fusarium* có khuẩn lạc phát triển nhanh, trắng đục, tím hay vàng nhạt. Cuống sinh bào tử phân nhánh. Bào tử thường có đai và tiểu bào tử, đai bào tử hình thuyền, có nhiều vách ngăn, tiểu bào tử có hình elip, trứng, cầu, quả lê, hình chùy. Khóa phân loại *Fusarium* (de Hoog et al., 2000) như sau:

1a Khuẩn lạc đạt 2 cm sau 7-10 ngày, đai bào tử có nhiều vách ngăn (1-4) .....2  
 1b Khuẩn lạc đạt 4-8 cm sau 7-10 ngày.....4  
 2a Đai bào tử dài 55 µm, xuất hiện bào tử vách dày.....*F. aquaeductuum*  
 2b Đai bào tử ngắn hơn 25 µm, bào tử vách dày có hoặc không .....3  
 3a Đai bào tử cong nhiều và nhọn ở đỉnh, có bào tử vách dày ..... *F. dimerum*  
 3b Đai bào tử hơi cong, không có bào tử vách dày..... *F. tabacinum*  
 4a Tiểu bào tử ít hoặc không, khuẩn lạc màu vàng nâu đến nâu, cuống sinh bào tử phát triển nhiều.....*F. incarnatum*  
 4b Nhiều tiểu bào tử.....5  
 5a Tiểu bào tử dạng chuỗi.....6  
 5b Tiểu bào tử không thành chuỗi.....9  
 6a Tiểu bào tử sinh ra từ thể bình đơn .....7  
 6b Tiểu bào tử sinh ra từ thể bình đa .....8  
 7a Tiểu bào tử có dạng tương tự trái cà chua hoặc trái chanh .....*F. napiforme*  
 7b Không có tiểu bào tử dạng trái cà chua hoặc trái chanh ..... *F. verticillioides*  
 8a Không có bào tử vách dày .....*F. proliferatum*  
 8b Có nhiều bào tử vách dày..... *F. nygamai*  
 9a Nhiều cuống sinh đa bào tử .....10  
 9b Không có cuống sinh đa bào tử .....13  
 10a Khuẩn lạc màu hơi đỏ, nhiều bào tử vách dày ..... *F. chlamyosporum*  
 10b Khuẩn lạc màu hồng hoặc rượ vang đến tím, không có bào tử vách dày.....11  
 11a Tiểu bào tử có hình trứng hoặc hình ellip hẹp sinh ra từ cuống sinh bào tử trên các khuẩn ty nằm ngang trên bề mặt môi trường, ..... *F. sacchari*  
 11b Tiểu bào tử được sinh ra từ các cuống sinh bào tử thẳng đứng .....12  
 12a Tiểu bào tử hình quả lê xuất hiện .....*F. anthophilum*

- 12b Không có tiểu bào tử hình quả lê..... *F. subglutinans*  
 13a Các tiểu bào tử trên các thể bình ngắn, đại bào tử không có dạng đế giày, khuẩn lạc màu trắng tới tía ..... *F. oxysporum*  
 13b Tiểu bào tử trên các thể bình đơn dài, đại bào tử có dạng đế giày, khuẩn lạc trắng, kem hoặc xanh dương ..... *F. solani*

## 6 KẾT LUẬN

Nấm là một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến ở động vật thủy sản gồm 2 nhóm đó là nấm bậc thấp chủ yếu nấm thủy mi như *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* và một số giống khác như *Branchiomyces*, *Lagenidium*, *Haliphthoros* và nấm bậc cao chủ yếu nhóm nấm bất toàn như *Fusarium*, *Exophiala*, *Ochroconis*, *Acremonium* và *Plectosporium*. Dấu hiệu bệnh lý thường gặp trên thân cá có túi màu trắng giống như bông, mang nhợt nhạt hay chuyển sang màu nâu hoặc đen ở giáp xác. Chẩn đoán bệnh bằng cách quan sát tiêu bản tươi, phân lập và định danh dựa vào đặc điểm hình thái của quá trình sinh sản vô tính và hữu tính.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alderman, D. J. and J. L. Polglase. 1985. *Fusarium tabacinum* (Beyma) Gams as a gill parasite in the crayfish, *Austropotamobius pallipes*. Journal of Fish Diseases 8: 249-252.
- Bian, B. Z. and S. Egusa. 1981. Histopathology of black gill disease caused by *Fusarium solani* (Martius) infection in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Journal Fish Diseases 4: 195-201.
- Burns, C. D., M. E. Berrigan and G. E. Henderson. 1979. *Fusarium* sp. infections in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Aquaculture 16: 193-198.
- Cabanes, F. J., J. M. Alonso, G. Castellá, F. Alegre, M. Domingo and S. Pont. 1997. Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Fusarium solani* in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta* L.). Journal of clinical microbiology 35: 3343-3345.
- Chukanhom, K., P. Borisutpeth, L. V. Khoa and K. Hatai. 2003. *Haliphthoros milfordensis* isolated from black tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon*) in Vietnam. Mycoscience 44: 123-127.
- 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 other water molds. The university of North Carolina press. Chapel Hill. 201 pp.
- de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor schimmelculture. 1126p.
- Diler, Ö. and Y. Bolat. 2001. Isolation of *Acremonium* species form crayfish, *Astacus leptodactylus* in Egirdir Lake. Bull. Eur. Ass. Fish Pathology 21: 164-168.
- Duc, P. M., K. Hatai, O. Kurata, K. Tensha, U. Yoshitaka, T. Yaguchi, S. I. Udagawa. 2009. Fungal infection of mantis shrimp, *Oratosquilla oratoria* caused by two anamorphic fungi found in Japan. Mycopathologia 167: 229-247.
- Duc, P. M. and K. Hatai. 2009. Pathogenicity of anamorphic fungi *Plectosporium oratosquillae* and *Acremonium* sp. to Mantis shrimp, *Oratosquilla oratoria*. Fish Pathology 44: 81-85.
- Duc, P. M. 2009. Studies on fungal infection on mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* due to anamorphic fungi. Luận án tiến sĩ.



- Egusa, S. and T. Ueda. 1972. A *Fusarium* sp. associated with black gill diseases of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 38: 1253-1260.
- 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. 109 pp.
- 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. Kubota, N. Kida, S. Udagawa. 1986a. *Fusarium oxysporum* in red sea beam, *Pagrus* sp. Journal Wildlife Diseases 22: 570-571.
- Hatai, K., Y. Fujimaki, S. Egusa. 1986b. A visceral mycosis in ayu fry, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel, caused by a species of *Phoma*. Journal Fish Diseases 9: 111-116.
- Hatai, K. and S. S. Kubota. 1989. A visceral mycosis in cultured masu salmon (*Oncorhynchus masou*) caused by a species of *Ochroconis*. Journal of wildlife diseases 25: 83-88.
- Hatai, K., W. Rhoobunjongde and S. Wada. 1992. *Haliphthoros milfordensis* isolated from gills of juvenile kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) with black gill disease. Trans. Mycol. Soc. Japan 33: 185-192.
- Hatai, K., D. Roza and T. Nakayama. 2000. Identification of lower fungi isolated from larvae of mangrove crab, *Scylla serrata*, in Indonesia. Mycoscience 41: 565-572.
- Ho, W. C. and W. H. Ko. 1997. A simple method for obtaining single spore isolates of fungi. Bot. Bull. Acad. Sinica 38: 41-44.
- Hose, J. E., D. V. Lightner, R. M. Redman and D. A. Donald. 1984. Observations on the pathogenesis of the imperfect fungus, *Fusarium solani*, in the Californian brown shrimp, *Penaeus californiensis*. J. Invertebr. Pathol. 44: 292-303.
- Hussein, M. M. A. and K. Hatai. 1999. *Saprolegnia salmonis* sp. nov. isolated from sockeye salmon, *Onchrhynchus nerka*. Mycoscience 40: 387-391.
- Hussein, M. M. A. and K. Hatai. 2002. Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid saprolegniosis in Japan. Fisheries science 68: 1067-1072.
- Ishikawa, Y. 1968. A fungus caused black gill condition in cultured kuruma prawn. Fish pathology 3: 34-49.
- Khoa, L. V., K. Hatai, and T. Aoki. 2004. *Fusarium incarnatum* isolated from black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius, with black gill disease cultured in Vietnam. Journal of Fish Diseases 27: 507-515.
- 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.
- Khoa, L. V., K. Hatai, A. Yuasa and K. Sawada. 2005. Morphology and molecular phylogeny of *Fusarium solani* isolated from Kuruma prawn *Penaeus japonicus* with black gills. Fish Pathology 40: 103-109.
- Khoo, L., A. T. Leard, P. R. Waterstrat, S. W. Jack and K. L. Camp. 1998. *Branchiomyces* infection in farm-reared channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Diseases 21: 423-31.
- Kitancharoen, N., K. Yuasa and K. Hatai. 1995. Morphological aspects of *Saprolegnia diclina* type 1 isolated from pejjery, *Odonthetes bonariensis*. Mycoscience 36: 365-368.
- 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. 1997. *Aphanomyces frigidophilus* sp. nov. from eggs of Japanese char, *Salvelinus leucomaenis*. Mycoscience 38: 135-140.

- Lightner, D. V. and C. T. Fontaine. 1975. A mycosis of the American lobster *Homarus americanus* caused by *Fusarium* sp. *Journal of Invertebrate* 25: 239-245.
- Momoyama, K. 1987. Distribution of the hyphae in kuruma prawn *Penaeus japonicus* infected with *Fusarium solani*. *Fish pathology* 22: 15-23.
- Munchan, C., O. Kurata, K. Hatai, N. Hashiba, N. Nakaoka and H. Kawakami. 2006. Mass mortality of young striped jack, *Pseudocaranx dentex* caused by a fungus *Ochroconis humicola*. *Fish Pathology* 41: 179–182.
- Munchan, C., C. Munchan, O. Kurata, S. Wada, K. Hatai, A. Sano, K. Kamei and N. Nakaoka. 2009. *Exophiala xenobiotica* infection in cultured striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), in Japan. *Journal of Fish Diseases* 32: 893-900.
- Muraosa, Y., O. Lawhavit and K. Hatai. 2006. *Lagenidium thermophilum* isolated from eggs and larvae of black tiger shrimp *Penaeus monodon* in Thai Lan. *Fish Pathology* 41 :35-40.
- Nakamura, K., S. Wada, K. Hatai and T. Sugimoto. 1994. *Lagenidium myophilum* infection in the coonstripe shrimp, *Pandalus hypsinotus*. *Mycoscience*. 35: 99-104.
- Nakamura, K. and K. Hatai. 1995. Three species of *Lagenidiales* isolated from the eggs and zoeae of the marine crab *Portunus pelagicus*. *Mycoscience* 36: 87-95.
- Nakamura, K., M. Nakamura, K. Hatai and Zafran. 1995. *Lagenidium* infection in eggs and larvae of mangrove crab (*Scylla serrata*) produced in Indonesia. *Mycoscience* 36: 399-404.
- Neish, G. A. and G. C. Hughes. 1980. Diseases of fishes, Book 6, Fungal Diseases of Fishes. T. W. F. Publications, Neptune, New Jersey. 159 pp.
- Panchai, K., C. Hanjavanit and N. Kitanchaoren. 2007. Characteristics of *Achlya bisexualis* isolated from eggs of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). *KKU Res J* 12 (3).
- Paperna, I. and D. D. Cave. 2001. Branchiomycosis in an Amazonian fish, *Baryancistrus* sp. (Loricariidae). *Journal of Fish Diseases* 24: 417–20.
- Roza, D. and K. Hatai. 1999. Pathogenicity of fungi isolated from the larvae of the mangrove crab, *Scylla serrata*, in Indonesia. *Mycoscience* 40: 427-431.
- Royo, F., G. Andersson, E. Bangyeekhun, J. L. Múzquiz, K. Soderhall and L. Cerenius. 2004. Physiological and genetic characterisation of some new *Aphanomyces* strains isolated from freshwater crayfish. *Veterinary Microbiology* 104: 103–112.
- Sinmuk, S., H. Suda and K. Hatai. 1996. *Aphanomyces* infection in juvenile soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*, imported from Singapore. *Mycoscience* 37: 249-254.
- Yanong, R. P. E. 2003. Fungal diseases of fish. *Vet Clin Exot Anim*. 6: 377–400.
- Yuasa, K., N. Panigoro, M. Bahnan and E. B. Kholidin. 2002. Manual for fish disease diagnosis. Japan international cooperation agency. JICA.