

NGHIÊN CỨU THUỐC KHÁNG NẤM VÀ HÓA CHẤT KHÁNG VI NẤM *PLECTOSPORIUM ORATOSQUILLAE* VÀ *ACREMONIUM SP.* TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Phạm Minh Đức¹ và Trần Ngọc Tuấn²

ABSTRACT

In vitro activities of Bronopol (B), hydrogen peroxide (HP), Formalin (F) and Sodium Hypochlorite (SH) against hyphal growth and conidia of *P. oratosquillae* NJM0662 and *Acremonium sp.* NJM0672 were examined. As a result, hyphal growth of the isolates NJM0662 and NJM0672 were strongly resistant to SH, and the MICs were 800 and 1600 ppm, respectively. The MICs of B, F and HP against hyphal growth and conidia of both isolates were 50, 200 and 400 ppm, respectively. MFCs of B, F and HP against hyphal growth and conidia of the isolate NJM0662 were 50, 150 and 400 and 50, 200 and 800 ppm, respectively, when exposed to the chemicals for 24h. While MFCs of B, F and HP on hyphal growth and conidia of the isolate NJM0672 were 50, 150 and 300 and 800, 400 and >1600 ppm, when exposed for 24h, respectively. As a result, it was concluded that B and HP were effective chemicals in this study. On the other hand, *in vitro* antifungal activities of fluconazole, amphotericin B, 5-fluorocytocine, terbinafine hydrochloride, micafungi, voriconazole, miconazole and itraconazole against these species showed that amphotericin B, voriconazole and terbinafine hydrochloride were effective both the isolates.

Keywords: *Acremonium sp.*, antifungal agents, chemicals, *P. oratosquillae*

Title: *In vitro* activities of chemicals and antifungal agents against *Plectosporium oratosquillae* and *Acremonium sp.*

TÓM TẮT

Nghiên cứu mức độ tác động của bronopol, oxy già, formol và sodium hypochlorite đến khả năng phát triển của sợi nấm và bào tử của hai chủng nấm *P. oratosquillae* NJM0662 and *Acremonium sp.* NJM0672 được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy hai chủng NJM0662 và NJM0672 kháng lại với sodium hypochlorite thể hiện ở nồng độ ức chế tối thiểu lần lượt là 800 và 1600 ppm. Nồng độ ức chế tối thiểu của bronopol, formol và oxy già với sợi nấm và bào tử của cả hai chủng lần lượt là 50, 200 và 400 ppm. Nồng độ kháng nấm tối thiểu của bronopol, formol và oxy già với sự phát triển của sợi nấm và bào tử của chủng NJM0662 lần lượt là 50, 150 và 400 và 50, 200 và 800 ppm, sau khi tiếp xúc 24 giờ. Trong khi đó, nồng độ kháng nấm tối thiểu của bronopol, formol và oxy già với sự phát triển của sợi nấm và bào tử của chủng NJM0672 lần lượt là 50, 150 và 300 và 800, 400 và >1600 ppm sau khi tiếp xúc 24 giờ. Như vậy, bronopol và oxy già là hai hóa chất hiệu quả. Mặt khác, tính nhạy của 8 loại thuốc kháng nấm fluconazole, amphotericin B, 5-fluorocytocine, terbinafine hydrochloride, micafungi, voriconazole, miconazole and itraconazole với hai chủng nấm này được thực hiện, kết quả cho thấy amphotericin B, voriconazole và terbinafine hydrochloride hiệu quả với cả hai chủng nấm thí nghiệm.

Từ khóa: *Acremonium sp.*, hóa chất, *P. oratosquillae*, thuốc kháng nấm

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

² TTUD&CGCN Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

1 GIỚI THIỆU

Trong nuôi trồng thủy sản, một số hóa chất thường được sử dụng để diệt vi nấm nhiễm trên cá đã được nghiên cứu (Willoughby and Roberts 1992; Kitancharoen *et al.*, 1997; Khoa 2005; Oono and Hatai, 2007). Trong đó, oxy già (H_2O_2) là hóa chất thường được sử dụng trong phòng và trị vi nấm nhiễm ở trứng cá và cá nuôi thương phẩm (Dawson *et al.*, 1994; Kitancharoen *et al.*, 1997). Thời gian gần đây, Bronopol ($C_3H_6BrNO_4$) được dùng phổ biến trong phòng và trị vi nấm nhiễm trên trứng cá hồi (Pottinger and Day, 1999; Branson, 2002; Oono *et al.*, 2007; Oono *et al.*, 2008). Ngoài ra, dung dịch natri hypoclorit ($NaClO$) ở nồng độ 200 ppm có khả năng ức chế vi nấm *Fusarium* (Khoa, 2005) và formol (HCHO) được sử dụng để phòng và trị bệnh ký sinh trùng cũng như nhiễm vi nấm ở cá hồi (Thorburn and Moccia, 1993). Mặt khác, khảo sát về tính nhạy của một số giống loài vi nấm đối với thuốc kháng nấm đã được nghiên cứu (McGinnis and Pasarell, 1998; Espinel-Ingroff, 2001; Kamai *et al.*, 2002; Vitale *et al.*, 2003; Serena *et al.*, 2003; Makimura *et al.*, 2004; Koga *et al.*, 2006). Trong đó, một số thuốc kháng vi nấm như voriconazole, itraconazole, amphotericin B and flucytosine đã và đang được sử dụng trong phòng và trị nhiễm vi nấm ở vật nuôi (Espinel-Ingroff, 2001; Vitale *et al.*, 2003). Nghiên cứu về thuốc kháng nấm thường áp dụng phương pháp pha loãng trong môi trường RPMI 1640 Nissui Nhật Bản (Manavathu *et al.*, 2000). Như vậy, việc đánh giá tính nhạy của vi nấm đối với thuốc kháng nấm và nồng độ ức chế tối thiểu có ý nghĩa nhiều trong việc chọn lựa thuốc kháng nấm và nồng độ sử dụng phù hợp. Chính vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sử dụng của một số thuốc kháng nấm và hóa chất đối với hai loài vi nấm *Plectosporium oratosquillae* NJM0662 và *Acremonium* sp. NJM0672 gây bệnh trên tôm tít Nhật Bản (Duc *et al.*, 2009).

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2009 tại Phòng Bệnh cá, Trường Đại học Thú y và Khoa học Đời sống Nhật Bản.

2.2 Vật Liệu

2.2.1 Hóa chất

Bốn loại hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: oxy già (H_2O_2) (MGC, Nhật Bản); dung dịch natri hypoclorit ($NaClO$), formol (HCHO) (Công ty Hóa chất Koso Nhật Bản) và Bronopol ($C_3H_6BrNO_4$) hay pyceze[®] (Công ty Novartis, Anh Quốc).

2.2.2 Vi nấm

Hai loài vi nấm bắt toàn là *P. oratosquillae* NJM0662 và *Acremonium* sp. NJM0672 được phân lập từ mang tôm tít *Oratosquilla oratoria* bị bệnh (Duc *et al.*, 2009) và được nuôi cấy lần lượt trong thời gian 1 tháng và 10 ngày trên môi trường thạch PYGS (0,125% Bacto peptone; 0,125% Bacto yeast extract; 0,3% glucose; 1,2% Difco agar và 3,8% muối biển), ủ 25°C.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Phương pháp nuôi cấy để thu bào tử

Vi nấm được nuôi cấy trong môi trường thạch PYGS trong thời gian 10 ngày (NJM0672) và 1 tháng (NJM0662), ở 25°C. Thu bào tử vi nấm bằng cách cho 10 ml nước muối sinh lý vô trùng vào đĩa Petri đang nuôi cấy vi nấm, dùng que cấy cào nhẹ trên bề mặt của đĩa thạch để bào tử tách ra khỏi cuống sinh bào tử. Huyền phù bào tử được lọc qua 2 lớp màng lọc y học tiệt trùng để thu bào tử nấm. Mật số bào tử nấm được xác định bằng buồng đếm hồng cầu. Mật số bào tử cao và thấp lần lượt là 10^4 và 10^2 bào tử/ml.

2.3.2 Ảnh hưởng hóa chất đến sự phát triển của vi nấm

Khuẩn lạc: thí nghiệm ảnh hưởng của hóa chất đến khả năng phát triển của sợi nấm được thực hiện theo phương pháp của Kobayashi and Medoff (1983). Nồng độ hóa chất căn cứ theo nghiên cứu của Kitancharoen *et al.* (1998); Khoa (2005); Oono *et al.* (2007); Jorgensen and Buchmann (2007). Nồng độ của bronopol và formol là 25, 50, 100, 200 và 400 ppm; oxy già và natri hypoclorit là 50, 100, 200, 400, 800 và 1600 ppm. Cách thực hiện như sau: lấy mỗi loại hóa chất hòa tan trong nước biển nhân tạo vô trùng (38‰). Lấy 2 ml dung dịch hóa chất cho vào đĩa Petri có chứa 18 ml môi trường thạch PGYS đang giữ nóng ở 60°C. Ở lô đối chứng thay thế dung dịch hóa chất bằng 2 ml nước biển nhân tạo. Dùng ống cắt nấm Cork borer số 2 cắt mẫu agar có nấm thuần cấy vào trung tâm đĩa Petri và ủ ở 25°C. Thí nghiệm được lập lại 3 lần. Đo đường kính của khuẩn lạc trong thời gian 15 ngày (NJM0662) và 7 ngày (NJM0672) bằng thước kẹp, từ đó tính bán kính khuẩn lạc. Khả năng ức chế của hóa chất được tính bằng tỷ lệ phần trăm bằng (bán kính khuẩn lạc trên đĩa có hóa chất/Bán kính khuẩn lạc trên đĩa đối chứng) x 100.

Bào tử nấm: căn cứ vào kết quả tác động ức chế của hóa chất đến khả năng phát triển của sợi nấm thì bronopol, formol và oxy già được sử dụng trong thí nghiệm này. Các nồng độ của bronopol, formol và oxy già được sử dụng lần lượt là 25, 50 và 100 ppm, 50, 100 và 200 ppm và 100, 200 và 400 ppm. Cách chuẩn bị môi trường có nồng độ hóa chất khác nhau được thực hiện như trên. Lấy 50 μ l dung dịch bào tử ở mật độ 10^4 bào tử/ml cho lên đĩa Petri trên và trải đều. Ở lô đối chứng môi trường thạch PYGS không có hóa chất, ủ ở 25°C, 1 tuần quan sát bào tử nảy mầm và ghi nhận kết quả. Thí nghiệm được lập lại 3 lần.

2.3.3 Tác dụng kháng vi nấm của hóa chất

Khuẩn lạc: căn cứ vào kết quả tác động ức chế của hóa chất đến khả năng phát triển của sợi nấm thì bronopol, formol và oxy già được sử dụng trong thí nghiệm này với nồng độ tương ứng là 50, 100, 200, 400 và 500 ppm, 150, 200, 300, 400 và 600 ppm và 200, 300, 400, 600, 800 và 1000 ppm. Ở lô đối chứng thay thế hóa chất bằng nước biển nhân tạo. Mẫu agar-nấm được cắt như ở mục 2.3.2, rồi ngâm vào các đĩa Petri có các nồng độ hóa chất khác nhau trong thời gian 10, 30, 60, 120, 180, 360 và 720 phút. Mẫu agar-nấm này được rửa ba lần bằng nước biển nhân tạo vô trùng, rồi đặt vào đĩa Petri có môi trường thạch PYGS, ủ ở 25°C trong 15 ngày.

Ghi nhận khả năng kháng nấm bằng quan sát trực tiếp mức độ phát triển của khuẩn lạc nấm nuôi cấy. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Bào tử nấm: lấy 1 ml huyền phù bào tử ở mật số 10^3 và 10^4 bào tử/ml và 3 ml mỗi loại hóa chất bronopol, formol và oxy già với nồng độ áp dụng cho khuẩn lạc cho vào đĩa Petri chứa 26 ml nước biển nhân tạo. Sau thời gian 10, 30, 60, 120, 180, 360 và 720 phút, lấy 50 μ l huyền phù bào tử này nuôi cấy trên môi trường thạch PYGS, ủ ở 25°C trong 15 ngày. Quan sát và ghi nhận kết quả khả năng diệt vi nấm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

2.4 Tính nhạy của thuốc kháng nấm

2.4.1 Thuốc kháng nấm và nồng độ sử dụng

Trong nghiên cứu này sử dụng 8 loại thuốc kháng nấm gồm: Fluconazole và Amphotericin B (Wako pure chemical industries, Nhật Bản), 5-Fluorocytosine (Tokyo chemical industry, Nhật Bản), Terbinafine hydrochloride (Novartis pharma K.K, Nhật Bản), Miconazole (Mochida pharmaceutical, Nhật Bản), Itraconazole (Janssen pharmaceutical, Nhật Bản) và Voriconazole (Pfizer pharma, Nhật Bản). Nồng độ thuốc kháng nấm từ 0,031; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 và 16 ppm.

2.4.2 Dung dịch thuốc kháng nấm gốc và huyền phù bào tử nấm

Dung dịch thuốc kháng nấm gốc được chuẩn bị theo mô tả trong NCCLS M38-A (Pfaller *et al.*, 2002). Huyền phù bào tử được chuẩn bị theo mô tả ở phần 2.3.1 và mật độ bào tử sử dụng là 10^5 bào tử/ml.

2.4.3 Môi trường

RPMI 1640 (10,2g RPMI 1640; 0,3g L-glutamine và 34,53g MOPS 3-N-morpholino propanesulfonic acid) được dùng làm môi trường chuẩn cho thí nghiệm đánh giá tính nhạy của thuốc kháng nấm. Môi trường được điều chỉnh ở pH 7.0 (dùng 1 mol/l NaOH), lọc qua màng lọc vô trùng kích thước 0,45 μ m (đường kính 47 mm) (Toyo roshi Kaisha, Nhật Bản) và môi trường được giữ ở 4°C đến khi thí nghiệm.

2.4.4 Phương pháp pha loãng môi trường nuôi cấy

Phương pháp pha loãng môi trường được mô tả trong tài liệu NCCLS M38-A (Pfaller *et al.*, 2002). Cho 100 μ l dung dịch bào tử nấm vào các giếng có chứa 100 μ l thuốc kháng nấm đã được pha loãng 2 lần. Nồng độ thuốc và mật số bào tử được pha loãng 2 lần. Hai giếng được dùng để làm đối chứng, trong đó một giếng chứa 100 μ l dung dịch dimethyl sulfoxide với 100 μ l nước biển nhân tạo vô trùng và một giếng chứa 200 μ l nước biển nhân tạo vô trùng. Khay 96 giếng được ủ ở 25°C để xác định nồng độ ức chế tối thiểu của thuốc kháng nấm với *Acremonium* sp. NJM0672 được kiểm tra sau 72 giờ và *P. oratosquillae* NJM0662 được kiểm tra sau 96 giờ.

Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory Concentration, MICs): nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ thấp nhất của thuốc kháng nấm ức chế khả năng phát triển của vi nấm. MIC được xác định bằng cách quan sát ức chế sự phát triển của vi nấm theo phương pháp chuẩn được mô tả trong tài liệu NCCLS M38-A.

Nồng độ kháng nấm tối thiểu (Minimum Fungicidal Concentration, MFC): nồng độ kháng nấm tối thiểu là nồng độ thấp nhất của thuốc kháng nấm ở đó nấm không phát triển hoặc phát triển ít hơn 3 khuẩn lạc (nấm chết 99,9%). Hoạt động của thuốc kháng nấm trong điều kiện phòng thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Espinel-Ingroff (1998).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của hóa chất đến sự phát triển của vi nấm

3.1.1 Ảnh hưởng của hóa chất đến sự phát triển của khuẩn lạc

Hợp chất bronopol hạn chế khả năng phát triển của hai loài vi nấm này tốt ở nồng độ 50 ppm (Bảng 1), trong khi đó formol và oxy già lần lượt ở nồng độ 200 ppm (Bảng 1) và 400 ppm (Bảng 2). Ngược lại, nồng độ sodium hypochlorite hạn chế sự phát triển của chủng nấm NJM0662 và NJM0672 lần lượt ở 1.600 và 400 ppm (Bảng 2).

Bảng 1: Ảnh hưởng của bronopol và formol đến khả năng phát triển khuẩn lạc

Nồng độ (ppm)	Chủng nấm ^a			
	<i>P. oratosquillae</i> NJM0662		<i>Acremonium sp.</i> NJM0672	
	Bronopol	Formol	Bronopol	Formol
0	100% ^b	100%	100%	100%
25	50,2	88,8	19,6	91,1
50	0	80,3	0	88,0
100	0	73,6	0	76,6
200	0	0	0	0
400	0	0	0	0

^a Đường kính khuẩn lạc hai chủng NJM0662 và NJM0672 được đo lần lượt sau 15 và 7 ngày.

^b Tỷ lệ % bán kính khuẩn lạc trên đĩa môi trường với các nồng độ bronopol và formol khác nhau so với đĩa đối chứng.

Bảng 2: Ảnh hưởng của Oxy già và sodium hypochlorite đến khả năng phát triển khuẩn lạc

Nồng độ (ppm)	Chủng nấm ^a			
	<i>P. oratosquillae</i> NJM0662		<i>Acremonium sp.</i> NJM0672	
	Oxy già	sodium hypochlorite	Oxy già	sodium hypochlorite
0	100% ^b	100%	100%	100%
50	87,5	98,6	96,6	96,6
100	60,7	96,9	06,2	06,2
200	46,1	88,8	77,3	77,3
400	0	87,1	0	0
800	0	81,7	0	0
1600	0	0	0	0

^a Đường kính khuẩn lạc hai chủng NJM0662 và NJM0672 được đo lần lượt sau 15 và 7 ngày.

^b Tỷ lệ % bán kính khuẩn lạc trên đĩa môi trường với các nồng độ oxy già và sodium hypochlorite khác nhau so với đĩa đối chứng.

3.1.2 Ảnh hưởng của hóa chất đến khả năng phát triển của bào tử nấm

Nồng độ ức chế tối thiểu của bronopol, formol và oxy già đến hai chủng NJM0662 và NJM0672 lần lượt là 50, 200 và 400 ppm (Bảng 3).

Bảng 3: Ảnh hưởng của hóa chất đến khả năng phát triển của bào tử nấm (10^4 bào tử/ml)

Chủng nấm ^a	MICs (ppm)		
	Bronopol	Formol	Oxy già
<i>P. oratosquillae</i> NJM0662	50 ^b	200	400
<i>Acremonium</i> sp. NJM0672	50	200	400

^a Khả năng phát triển sau 5-30 ngày nuôi cấy.

^b Nồng độ ức chế tối thiểu (ppm).

3.2 Khả năng diệt vi nấm của hóa chất

3.2.1 Khả năng diệt sợi nấm của hóa chất

Khả năng diệt sợi nấm khác nhau tùy vào loại hóa chất và thời gian hiệu lực. Hóa chất bronopol và formol lần lượt ở nồng độ 50 và 150 ppm diệt hoàn toàn sợi nấm của hai chủng NJM0662 và NJM0672 ngâm trong 24 giờ (Bảng 4). Tuy nhiên, oxy già cần nồng độ cao hơn để diệt hoàn toàn sợi nấm của 2 chủng NJM0662 và NJM0672 lần lượt ở 400 và 300 ppm ngâm trong 24 giờ (Bảng 4).

Bảng 4: Khả năng diệt vi nấm (khuẩn lạc và 10^4 bào tử/ml) của bronopol, formol và oxy già

Chủng nấm ^a		Thời gian tiếp xúc hóa chất						
		10	30 phút	1	2	6	12	24 giờ
Bronopol								
NJM0662	Sợi nấm	>500 ^b	>500	>500	400	400	400	50
	Bào tử	>800	>800	>800	600	400	400	50
NJM0672	Sợi nấm	>400	>400	>400	400	200	50	50
	Bào tử	>800	>800	>800	800	800	800	400
Formol								
NJM0662	Sợi nấm	>600	>600	>600	>600	>600	600	150
	Bào tử	>1600	>1600	>1600	>1600	800	800	200
NJM0672	Sợi nấm	>600	>600	>600	600	300	150	150
	Bào tử	>1600	>1600	>1600	>1600	800	800	400
Oxy già								
NJM0662	Sợi nấm	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	400
	Bào tử	>1600	>1600	>1600	>1600	1600	1600	800
NJM0672	Sợi nấm	>1000	>1000	>1000	>1000	800	300	300
	Bào tử	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600

^a Sợi nấm được kiểm tra sau 15 ngày.

^b Nồng độ diệt nấm tối thiểu (ppm).

3.2.2 Khả năng diệt bào tử nấm của hóa chất

Khả năng diệt bào tử nấm tùy thuộc vào hóa chất và mật số bào tử. Tuy nhiên, nồng độ hóa chất diệt bào tử nấm cao hơn nồng độ hóa chất diệt sợi nấm. Hóa chất bronopol ở nồng độ 50 ppm diệt hoàn toàn bào tử nấm chủng NJM0662 ở mật số cao (10^4 bào tử/mL) và thấp (10^2 bào tử/mL) và chủng NJM0672 ở mật số bào tử cao và thấp lần lượt là 400 và 200 ppm, ngâm trong 24 giờ (Bảng 4 và 5). Đối với formol ở nồng độ 200 và 400 ppm, ngâm 24 giờ, diệt hoàn toàn bào tử nấm ở mật số cao 10^4 bào tử/mL của 2 chủng nấm lần lượt là NJM0662 và NJM0672 (Bảng 4). Trong khi đó hóa chất oxy già ở nồng độ 800 và >1.600 ppm, ngâm 24 giờ diệt hoàn toàn bào tử nấm ở mật số cao 10^4 bào tử/mL của 2 chủng nấm lần

lượt là NJM0662 và NJM0672 (Bảng 4), ngược lại ở mật số bào tử thấp 10^2 bào tử/mL nồng độ oxy già diệt bào tử nấm của 2 chủng nấm NJM0662 và NJM0672 lần lượt là 400 và 800 ppm (Bảng 5).

Bảng 5: Khả năng diệt bào tử nấm ở mật độ 10^2 bào tử/ml của bronopol và oxy già

Chủng nấm ^a	Thời gian tiếp xúc				
	30 phút	1	2	6	24 giờ
Bronopol					
<i>P. oratosquillae</i> NJM0662	50 ^b	50	50	50	50
<i>Acremonium</i> sp. NJM 0672	200	200	200	200	200
Oxy già					
<i>P. oratosquillae</i> NJM0662	1600 ^b	800	800	800	400
<i>Acremonium</i> sp. NJM 0672	>1600	>1600	1600	1600	800

^a Sợi nấm được kiểm tra sau 15 ngày.

^b Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) (ppm).

Như vậy, ba loại hóa chất bronopol, formol và oxy già tác động đến khả năng phát triển của cả hai chủng nấm NJM0662 và NJM0672 nhưng sodium hypochlorite thì không ảnh hưởng. Nhìn chung, nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ kháng nấm tối thiểu của các loại hóa chất đối với khả năng phát triển của nấm thấp hơn đối với bào tử nấm. Trong số các nhóm hóa chất sử dụng, bronopol có hiệu quả kháng nấm cao nhất. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây với nhóm nấm *Saprolegnia* (Oono and Hatai, 2007). Nồng độ ức chế tối thiểu của bronopol với giống *Saprolegnia* là 100-200 ppm và với nồng độ 50-100 ppm thì bronopol có thể được sử dụng trong các trại giống bị nhiễm nấm (Oono *et al.*, 2007; Oono *et al.*, 2008). Nồng độ ức chế tối thiểu của sodium hypochlorite là 1600 ppm, tuy nhiên với một nghiên cứu trên bào tử của nấm *Fusarium incarnatum* NJM0177 khi tiếp xúc với sodium hypochlorite ở nồng độ 500 ppm thì ức chế sự phát triển của sợi nấm (Khoa, 2005). Bên cạnh đó, nồng độ của formol 400 ppm được đánh giá là có hiệu quả với loài *Saprolegnia* sp. (Khodabandeh và Abtahi, 2006). Ở nghiên cứu này cho thấy sau 24 giờ tiếp xúc của bào tử nấm ở mật số 10^2 bào tử/ml với oxy già trên hai chủng nấm NJM0662 và NJM0672 lần lượt là 400 và 800 ppm. Kết quả này phù hợp với những nhận định trước đây khi sử dụng oxy già để kiểm soát bệnh nấm trong trại sản xuất giống cá hồi (Kitancharoen *et al.*, 1997; Kitancharoen *et al.*, 1998; Ghomi *et al.*, 2007).

3.3 Tính nhạy của thuốc kháng nấm

Độ nhạy của 8 loại thuốc kháng nấm dùng trong thí nghiệm này thể hiện ở Bảng 6. Kết quả cho thấy amphotericin B, terbinafine hydrochloride và voriconazole tác động mạnh đến cả hai chủng nấm thí nghiệm (NJM0662 và NJM0672). Trong khi đó, itraconazole tác động mạnh đến chủng NJM0662 nhưng lại không tác động đến chủng NJM0672. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ kháng nấm tối thiểu của amphotericin B đối với hai chủng NJM0662 và NJM0672 lần lượt là 0,125 và 0,25 ppm. Nồng độ ức chế tối thiểu của terbinafine hydrochloride và voriconazole với chủng NJM0662 lần lượt là 1 và 0,25 ppm, nồng độ kháng nấm tối thiểu của terbinafine hydrochloride hoặc voriconazole với chủng NJM0662 là 2 ppm. Tuy nhiên, với chủng NJM0672 nồng độ ức chế tối thiểu của terbinafine hydrochloride và voriconazole là 1 ppm và nồng độ kháng nấm tối thiểu của terbinafine

hydrochloride và voriconazole lần lượt là 1 và 2 ppm. Mặt khác, các nhóm thuốc fluconazole, micafungin, miconazole, itraconazole và 5-fluorocytocine thì không tác động đến cả hai chủng nấm thí nghiệm NJM0662 và NJM0672.

Bảng 6: Tác động của thuốc kháng nấm đối với hai chủng *P. oratosquillae* NJM0662 và *Acremonium* sp. NJM 0672 trong điều kiện phòng thí nghiệm

Thuốc kháng nấm	<i>P. oratosquillae</i> NJM0662		<i>Acremonium</i> sp. NJM0672	
	MIC ^a (ppm)	MFC (ppm)	MIC ^b (ppm)	MFC (ppm)
Fluconazole	8	>16	>16	NT
Amphotericin B	0,125	0,125	0,25	0,25
5-Fluorocytocine	>64	NT	>64	NT
Terbinafine hydrochloride	1	2	1	1
Micafungin	4	8	>16	NT
Voriconazole	0,5	2	1	2
Miconazole	0,25	4	>16	NT
Itraconazole	0,25	1	>16	NT

MIC: nồng độ ức chế tối thiểu; MFC: nồng độ kháng nấm tối thiểu.

^a MIC và MFC được thực hiện ở 96 giờ; ^b MIC và MFC được thực hiện ở 72 giờ.

NT: không thí nghiệm.

Tính mẫn cảm với các loại thuốc kháng nấm thịnh thoảng được tìm thấy trong các nhóm nấm. Trong nghiên cứu này cho thấy *Acremonium* sp. NJM0672 nhạy với amphotericin B, terbinafine và voriconazole nhưng lại kháng với fluconazole, 5-fluorocytocine, micafungi, miconazole và itraconazole. Mặt khác, *P. oratosquillae* NJM0662 mẫn cảm với amphotericin B, itraconazole, voriconazole và terbinafine hydrochlorite nhưng lại kháng với fluconazole, 5-fluorocytocine, micafungi và miconazole. Ba loại thuốc kháng nấm amphotericin B, voriconazole và terbinafine hydrochloride có tác động lớn nhất với hai chủng nấm thí nghiệm. Nồng độ ức chế tối thiểu của amphotericin B là 0,25-2 mg/l có ý nghĩa với các nhóm nấm bậc toàn khác như *Exophiala spinifera* (Vitale *et al.*, 2003). Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây ở các nhóm thuốc kháng nấm như voriconazole, amphotericin B và itraconazole có hiệu quả với các nhóm nấm sợi Ascomycetes và Dematiaceous (McGinnis and Pasarell, 1998; Espinel-Ingroff, 2001). Như vậy, amphotericin B, voriconazole và terbinafine hydrochloride có hiệu quả trong kháng nấm với hai chủng *P. oratosquillae* NJM0662 và *Acremonium* sp. NJM0672 trong điều kiện phòng thí nghiệm. Trong khi đó, itraconazole chỉ có ý nghĩa trong ức chế chủng NJM0662 phát triển.

4 KẾT LUẬN

Bronopol, oxy già và formol có hiệu quả ức chế khả năng phát triển của sợi nấm và bào tử của hai chủng nấm *P. oratosquillae* NJM0662 và *Acremonium* sp. NJM0672 trong điều kiện phòng thí nghiệm. Cả hai chủng nấm này đều kháng với sodium hypochlorite. Nồng độ ức chế tối thiểu của sodium hypochlorite với hai chủng nấm NJM0662 và NJM0672 lần lượt là 800 and 1600 ppm và của bronopol, formol và oxy già với sợi nấm và bào tử của cả hai chủng nấm lần lượt là 50, 200 và 400 ppm. Nồng độ diệt nấm tối thiểu của bronopol, formol and oxy già tùy

thuộc vào thời gian tiếp xúc của sợi nấm và bào tử nấm với mỗi loại hóa chất. Mặt khác, amphotericin B, voriconazole và terbinafine hydrochloride có hiệu quả trong diệt nấm với hai chủng nấm này trong điều kiện phòng thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Branson, E., 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. The Veterinary Record 151:539-541.
- Dawson, V.K., J.J. Rach and T.M. Schreier, 1994. Hydrogen peroxide as a fungicide for fish culture. Bull. Aquacul. Assoc. Canada 2:54-56.
- 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.
- Espinel-Ingroff, A., 2001. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itrconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. Journal of clinical microbiology 4:954-958.
- Ghomi, M.R., A. Esmaili, G. Vossoughi, A. Keyva and R.M. Nazari, 2007. Comparison of ozone, hydrogen peroxide and removal of infected eggs for prevention of fungal infection in sturgeon hatchery. Fisheries Science 73:1332-1337.
- Jørgensen, T.R. and K. Buchmann, 2007. Stress response in rainbow trout during infection with *Ichthyophirius multifiliis* and formalin bath treatment. Acta Ichthyologia et Piscatoria 37:25-28.
- Kamai, Y., T. Harasaki, T. Fukuoka, S. Ohya, K. Uchida, H. Yamaguchi and S. Kuwahara, 2002. In vitro and in vivo activities of CS-758 (R-120758), a New Triazole antifungal agent. Antimicrobial agents and chemotherapy 3:367-370.
- Khoa, L.V., 2005. Studies on *Fusarium* injection of cultured prawn in Vietnam and Japan. Dissertation submitted to Nippon Veterinary and Life Science University in partial fulfillment of the Degree of Doctor of Philosophy. 169 pp.
- Khodabandeh, S. and B. Abtahi, 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. Journal Apply Ichthyology 22:54-56.
- Kitancharoen, N., A. Yamamoto and K. Hatai, 1997. Fungicidal effect of hydrogen peroxide on fungal infection rainbow trout eggs. Mycoscience 38:375-378.
- Kitancharoen, N., A. Yamamoto and K. Hatai, 1998. Effects of sodium chlorite, hydrogen peroxide and malachite green on fungal infection in Rainbow trout eggs. Biocontrol Science 3:113-115.
- Kobayashi, G.S. and G. Medoff, 1983. Measurement of activity of antifungal drugs. In: Fungi pathogenic for humans and animals. Part B: Pathogenicity and detection: I. Howard, D. H. (ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 357-372.
- Koga, H., Y. Tsuji, K. Inoue, K. Kanai, T. Majima, T. Kasai, K. Uchida and H. Yamaguchi, 2006. In vitro antifungal activity of luliconazole against clinical isolates from patients with dermatomycoses. J. Infect. Chemother 12:163-165.
- Makimura, K., T. Suzuki, T. Tamura, M. Ikedo, R. Hanazawa, Y. Takahashi, Y. Yamada, K. Uchida and H. Yamaguchi, 2004. Comparative evaluation of standard dilution method and commercial Kit for frozen plate antifungal susceptibility testing of yeasts using 200 clinical isolates. Microbiol. Immunol., 48:747-753.
- Manavathu, E., U. Nune, K. Kanuri, P.H. Chandrasekar and O.C. Abraham, 2000. Effect of test medium on vi tro susceptibility testing results for *Aspergillus fumigatus*. Rev. Iberoam. Mico.17:107-110.

- McGinnis, M.R. and L. Pasarell, 1998. In vitro testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to virionazole, itrconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *Journal of clinical microbiology* 3:2353-2355.
- Oono, H. and K. Hatai, 2007. Antifungal activities of bronopol and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MT) against *Saprolegnia*. *Biocontrol science* 12:145-148.
- Oono, H., K. Hatai, H. Aikawa and H. Hara, 2008. The use of bronopol to control fungal infection in Ayu eggs. *Aquaculture Science* 56:9-12.
- Oono, H., K. Hatai, M. Miura, N. Tuchida and T. Kiryu, 2007. The use of bronopol to control fungal infection in rainbow trout eggs. *Biocontrol science* 12:55-57.
- Pfaller, M.A., V. Chaturvedi, A. Espinel-Inogroff, M.A. Ghanoum, L.L. Gosey, F.C. Odds, J.H. Rex, M.G. Rinaldi, D.J. Dheehan, T.J. Walsh and D.W. Warnock, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard. M38-A, Vol.22 No.16.
- Pottinger, T.G. and J.G. Day, 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Dis. Aquat. Org.* 36:129-141.
- Serena, C., M. Ortoneda, J. Capilla, F.J. Pator, D.A. Sutton, M.C. Rinaldi and J. Guarro, 2003. In vitro activities of new antifungal agents against *Chaetomium* spp. And inoculum standardization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 4:3161-3164.
- Thorburn, M.A. and R.D. Moccia, 1993. Use of chemotherapeutics on trout farm in Ontario. *Journal of Aquatic Animal health*. 5:85-91.
- Vitale, R.G., J. Afeltra, G.S. de Hoog, A.J. Rijs and P.E. Verweij, 2003. *In vitro* activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:1297-2300.
- Willoughby, L.G. and R.J.W. Roberts, 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *J. Fish Dis.* 15:1-13.