

ẢNH HƯỞNG CỦA BASUDIN 50EC LÊN HOẠT TÍNH ENZYME CHOLINESTERASE VÀ TĂNG TRỌNG CỦA CÁ LÓC (*Channa striata*)

Nguyễn Văn Công¹, Nguyễn Xuân Lộc¹,
Lư Thị Hồng Ly¹ và Nguyễn Thanh Phương²

ABSTRACT

Effects of diazinon on (i) activity of enzyme cholinesterase (ChE) and (ii) specific growth rate of snakehead fish (Channa striata) were assessed at three concentrations of diazinon, 0.016, 0.079 and 0.35 mg/L prepared from basudin 50EC which were randomly designed in continuously aerated fiberglass tank system during 60 days in the laboratory. The results showed that the enzyme is very sensitive to diazinon and significantly inhibited at 0.016 mg/L. The ChE inhibition tend to increase with increased concentration of diazinon. The complete recovery of ChE was found only in the lowest concentration of diazinon at the end of the experiment. Specific growth rate was significantly inhibited at the highest concentration (0.35 mg/L) of diazinon with 50% and 30% at the day 40 and 60, respectively. Measurement of ChE activity in snakehead can be used as a biomarker for indicating effects from organophosphate insecticide such as basudin on aquatic organisms. It is crucial to reduce using of basudin or use alternative insecticides, which have lesser effects on aquatic organisms.

Keywords: basudin 50EC, *Channa striata*, cholinesterase, growth

Title: *Effects of Basudin 50EC on cholinesterase activity and growth of snakehead fish (Channa striata)*

TÓM TẮT

Ảnh hưởng của diazinon lên (i) hoạt tính enzyme cholinesterase (ChE) và (ii) tăng trọng tương đối – Specific Growth Rate (SGR) của cá Lóc (Channa striata) được đánh giá ở ba mức nồng độ diazinon 0,016 mg/L, 0,079 mg/L và 0,35 mg/L pha từ Basudin 50EC bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trong thời gian 60 ngày trong hệ thống bể composite có sục khí liên tục. Kết quả cho thấy diazinon làm giảm đáng kể hoạt tính ChE ở nồng độ 0,016 mg/L. Sự ức chế này gia tăng theo sự gia tăng nồng độ. Hoạt tính ChE chỉ phục hồi hoàn toàn ở nồng độ 0,016 mg/L khi kết thúc thí nghiệm. Tốc độ tăng trưởng tương đối (%/ngày) chỉ bị ức chế ở nồng độ cao nhất (0,35mg/L) ($p < 0,05$), mức độ ức chế khoảng 50% so với đối chứng ở 40 ngày và giảm còn khoảng 30% ở thời điểm kết thúc thí nghiệm. Kết quả cho thấy việc xác định hoạt tính ChE có thể dùng làm chỉ thị để phát hiện ra sinh vật bị ảnh hưởng bởi diazinon. Hoạt chất này rất độc và đã làm giảm sinh trưởng cá trong điều kiện phòng thí nghiệm. Đây là bằng chứng cho thấy cần chọn hóa chất ít độc hơn để sử dụng trên đồng ruộng.

Từ khóa: Basudin 50EC, *Channa striata*, cholinesterase, tăng trọng

1 GIỚI THIỆU

Cá Lóc đồng (*Channa striata*) là loài hô hấp khí trời bắt buộc (Vivekanandan, 1977), có khả năng thích ứng với những biến đổi rộng của điều kiện môi trường (Lee & Ng, 1994) và được tìm thấy ở nhiều loại hình thủy vực khác nhau như sông, ao, hồ, kênh, ruộng (Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993).

¹ Bộ môn Môi trường và Quản lý tài nguyên thiên nhiên - Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng

² Khoa Thủy Sản

Không may, nơi sinh sống rộng lớn của cá Lóc (đồng ruộng) ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) đã bị tác động mạnh từ việc thâm canh nhiều vụ lúa. Ước tính có đến 30.000 tấn thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) được sử dụng hàng năm trên đồng ruộng (Berg, 2001). Trong số đó có đến 1.151 tên thương phẩm với 266 tên hoạt chất khác nhau được phép lưu sử dụng (Bộ NN&PTNT, 2003). Do đó, cá Lóc sống trên đồng ruộng sẽ có nhiều cơ hội tiếp xúc với thuốc BVTV và chần chẫn khó tránh khỏi ảnh hưởng.

Ảnh hưởng của thuốc BVTV lên sinh vật nói chung và thủy sinh vật hay một số loài cá nói riêng đã được nghiên cứu từ nồng độ gây chết (LC50) đến nồng độ dưới ngưỡng gây chết. Trong thực tế, vấn đề thuốc BVTV gây chết hàng loạt các loài cá ít khi xảy ra, trừ phi có những sự cố. Đa số nồng độ thuốc BVTV tồn tại trong môi trường ở mức dưới ngưỡng gây chết (Murty, 1988). Arunachalam và Palanichamy (1982) cho thấy cá có cơ quan hô hấp khí trời *Macropodus cupanus* không giảm ăn nhưng giảm sinh trưởng và tăng sản phẩm bài tiết và đờp khí trời khi sống trong nồng độ dưới ngưỡng gây chết của carbaryl (carbamate) trong 26 ngày. Hồ Thị Thanh Tuyền (1999) cũng cho biết hoạt chất diazinon có trong basudin 40 EC đã làm giảm tăng trọng cá trê vàng ở nồng độ dưới ngưỡng gây chết.

Basudin có hoạt chất gây hại là “diazinon” là thuốc BVTV gốc lân hữu cơ, đã được bày bán phổ biến với nhiều mức tỷ lệ phần trăm hoạt chất khác nhau ở ĐBSCL. Thuốc basudin có công dụng diệt trừ sâu hại trên cây ăn quả và ruộng lúa. Thuốc được khuyến cáo sử dụng 2 lần trong vụ lúa, lúc 25 ngày tuổi và 45 hoặc 65 ngày. Giống như các loại hoá chất BVTV gốc lân hữu cơ và carbamate, diazinon gây hại cho sinh vật chủ yếu qua tác động lên hệ thần kinh thông qua ức chế hoạt tính của enzyme cholinesterase (ChE); hoá chất này có thời gian bán rã rất lâu ở pH trung tính nhưng phân huỷ nhanh trong môi trường kiềm hoặc acid (Tomlin, 1994).

Ảnh hưởng của Basudin lên hoạt tính ChE và tăng trọng cá Lóc sau hai lần phun như chỉ dẫn chưa được rõ. Nghiên cứu này được vạch ra nhằm tìm hiểu khả năng ảnh hưởng của Basudin 50EC (hoạt chất diazinon) đến cá Lóc ở điều kiện phòng thí nghiệm thông qua xem xét (i) tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR) và (ii) hoạt tính enzyme cholinesterase. Với kết quả đạt được chúng tôi có thể đề nghị chỉ thị nhạy cảm nhất để chẩn đoán ảnh hưởng của thuốc lên cá Lóc. Kết quả này có thể là bằng chứng cho thấy tác hại của việc sử dụng thuốc BVTV đến nguồn thực phẩm xung quanh và hàng ngày của người dân nông thôn. Từ đó có thể giúp họ nhận thức về bảo vệ môi trường mà hạn chế sử dụng thuốc BVTV trên đồng ruộng, đồng thời giải thích nguyên nhân góp phần làm suy giảm quần đàn cá Lóc trong tự nhiên.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Thí nghiệm được triển khai tại Bộ môn Môi trường và Quản lý tài nguyên thiên nhiên, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng. Thời gian triển khai thí nghiệm từ tháng 5 đến tháng 12 năm 2005.

2.2 Hoá chất

Thuốc trừ sâu Basudin 50EC chứa 50% trọng lượng hoạt chất diazinon [*6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl ester*] và 50% chất phụ gia do Công ty dịch vụ bảo vệ thực vật An Giang sản xuất được sử dụng để xem xét ảnh hưởng của hoá chất lên cá Lóc trong nghiên cứu này.

2.3 Sinh vật thí nghiệm

Cá Lóc thí nghiệm có trọng lượng khoảng ($10,46 \pm 1,92$ g), thời gian ương nuôi khoảng 4 tháng. Cá bột được ương trong bể composite (600 L) với mật độ 200 con/bể tại bộ môn Môi Trường và Quản lý tài nguyên thiên nhiên – Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng - Đại học Cần Thơ. Hàng ngày cá được cho ăn bằng trùng chỉ và thay nước 2 lần (nước máy). Cá ương nuôi trong bể được sục khí liên tục nhằm đảm bảo oxy hòa tan >5 mg/L. Cá khỏe mạnh và đồng cỡ được chọn cho nghiên cứu này.

2.4 Bố trí thí nghiệm

Nguồn nước thí nghiệm được trữ một ngày trước khi sử dụng, nước có pH là 6,81, độ kiềm tổng $57,4 \pm 1,14$ (mgCaCO₃/L), độ cứng tổng $3,24 \pm 0,26$ (mgCaCO₃/L).

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với ba mức nồng độ diazinon (0,016, 0,079 và 0,35 mg/L) pha từ Basudin 50EC và nghiệm thức đối chứng (không có diazinon). Mỗi nghiệm thức có ba lần lặp lại. Các nghiệm thức được ký hiệu lần lượt là A (đối chứng), B (0,016 mg/L), C (0,079 mg/L) và D (0,35 mg/L).

Bất ngẫu nhiên 30 con cá từ bể nuôi thả vào từng bể thí nghiệm đã chuẩn bị sẵn nồng độ diazinon như dự kiến. Trong 4 ngày kể từ khi cho thuốc vào, cá không được cho ăn, không thay nước. Sau đó cá được thay nước 100% lượng nước và tăng thể tích nước lên 100 L/bể. Cá được cho ăn hàng ngày bằng cá Bạc Má xay nhuyễn với lượng bằng 5% trọng lượng cơ thể cá nhằm đảm bảo đủ năng lượng cho hoạt động và sinh trưởng (Qin *et al.*, 1997). Sau 20 ngày kể từ ngày bố trí thuốc vào lần đầu tiên, cá được bố trí vào thuốc giống như ban đầu. Cũng giống như lần bố trí thứ nhất, suốt 4 ngày cá không được cho ăn và thay nước. Sau đó cá thay nước 100% và cho ăn tương tự như đã mô tả.

2.4.1 Theo dõi, chăm sóc cá và thu mẫu

Hệ thống thí nghiệm được sục khí liên tục. Cá được cho ăn mỗi ngày một lần, hàng ngày thay 50% thể tích nước trong bể vào buổi sáng. Theo dõi các hoạt động của cá như tốc độ bơi lội, khả năng đớp mồi, ghi nhận số cá chết hàng ngày và bắt ra (nếu có).

Nhiệt độ, DO, pH được đo 2 ngày 1 lần vào buổi sáng (7 – 8h) và chiều (14 – 15h) bằng máy 556 YSI (USA).

Cá được thu ở các ngày 4, 20, 24, 40, 60 tính từ lần bố trí đầu tiên. Mỗi nghiệm thức thu 12 con (4 con/bể). Cá sau khi thu sẽ được giết ngay bằng cách cho vào thùng mốp chứa sẵn nước đá.

2.4.2 Chuẩn bị và phân tích mẫu

Cá sau khi giết được cân trọng lượng cá bằng cân điện tử có độ chính xác 0,001g (Sartorius, Germany) và đo chiều dài tổng bằng thước, chiều dài tổng được tính từ

mỡm đến chót đuôi. Tàng não được lấy ra và cho vào tàng ống tuýp nhựa 1.5 mL riêng biệt đã cân trước trọng lượng. Tàng ống tuýp nhựa đã chứa não được cân lần hai để tính trọng lượng não của tàng cá. Tàng não được nghiền riêng biệt bằng cối nghiền và cho dung dịch đệm 0,1M phosphate pH 7,4 vào sao cho nồng độ não nghiền tương đương 25 mg não/mL. Trộn đều, lấy 1 mL dung dịch này cho vào ống tuýp nhựa và ly tâm ở 4⁰C, tốc độ 2000 vòng/phút trong 20 phút bằng máy ly tâm (Sigma, Germany). Sau khi ly tâm phần trong phía trên của mẫu ly tâm được xem là nguồn enzyme. Hoạt tính của enzyme ChE được đo bằng máy so màu quang phổ (U-2800, HITACHI, Japan) ở bước sóng 412 nm trong 200 giây (Ellman *et al.*, 1961). Kết quả sẽ được ghi nhận khi hệ số tương quan (r²) sau mỗi lần đo đạt từ 0,9 trở lên. Mỗi mẫu đo được chuẩn bị bằng cách cho 2,65 mL dung dịch 0,1M phosphate pH 7,4 vào cuvet nhựa, tiếp tục cho 0,1 mL dung dịch 3mM DTNB và 0,05 mL 10mM acetylcholine iodide. Sau đó cho 0,2 mL dung dịch mẫu não đã ly tâm vào và bắt đầu đo. Mẫu trắng cũng cho hoá chất tương tự như mẫu não nhưng lấy 0,2mL dung dịch đệm 0,1M phosphate pH 7,4 thay cho dung dịch mẫu não.

Hoạt tính của enzyme ChE được tính theo công thức sau:

$$HT = \frac{A * C_v * H_v}{F * L * S_v * P_v}$$

Trong đó:

- A: độ hấp phụ mẫu trong 1 phút (Abs/phút) - độ hấp phụ mẫu trắng (Abs/phút),
- C_v: thể tích cuvet = ml,
- H_v: thể tích dung dịch đệm sử dụng để nghiền mẫu (ml),
- F: hệ số = 13,6
- L: Chiều dài cuvet (cm),
- S_v: thể tích mẫu sau khi ly tâm (ml),
- P_v: trọng lượng mẫu lấy nghiền (g).
- Tỷ lệ enzyme bị ức chế tính theo công thức sau:

$$T(\%) = 100 - \frac{A}{A_0} 100$$

Trong đó:

- T (%) là tỷ lệ phần trăm bị ức chế so với đối chứng,
- A là hoạt tính ChE ở nghiệm thức có diazinon
- A₀ là hoạt tính ChE ở nghiệm thức đối chứng.
- Tốc độ sinh trưởng tương đối hay tốc độ sinh trưởng tương đối (SGR%/ngày) được tính theo công thức sau:

$$SGR\%/ngày = 100 * (\ln W_c - \ln W_d) / \text{thời gian (ngày)}$$

Trong đó:

- W_c : trọng lượng cuối (g).
- W_d: trọng lượng đầu (g).

2.5 Xử lý số liệu

Số liệu về hoạt tính ChE và tăng trọng tương đối (SGR) được kiểm tra dạng phân phối trước khi xử lý thống kê. Số liệu phân phối chuẩn được xử lý bằng phân tích phương sai (one-way ANOVA) và dùng kiểm định Dunnett t test để so sánh với đối chứng. Số liệu không phân phối chuẩn được xử lý thống kê bằng Mann-Whitney U test. Phần mềm SPSS được dùng để xử lý thống kê.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả

3.1.1 Biến động nhiệt độ, oxy hòa tan (DO) và pH trong thời gian thí nghiệm

Nhiệt độ trung bình trong quá trình thí nghiệm dao động trong khoảng $24,74 \pm 1,24^\circ\text{C}$ vào buổi sáng (7-8 giờ) và $27,27 \pm 1,25^\circ\text{C}$ vào buổi chiều (14-15 giờ). Nhiệt độ buổi chiều cao hơn buổi sáng và khoảng chênh lệch trung bình giữa hai buổi sáng là $2,5^\circ\text{C}$. Nhiệt độ trung bình không khác biệt lớn giữa các nghiệm thức, sự khác biệt chỉ nằm trong giới hạn $\leq 1^\circ\text{C}$ (Bảng 1). Điều này cho thấy nhiệt độ hầu như đồng nhất trong các nghiệm thức thí nghiệm.

Oxy hòa tan (DO) cũng không có sự khác biệt lớn giữa các nghiệm thức và có giá trị trung bình là $6,78 \text{ mg/L} \pm 0,56$ vào buổi sáng và $6,36 \text{ mg/L} \pm 0,6$ vào buổi chiều (Bảng 1). Buổi sáng cao hơn buổi chiều bình quân khoảng $0,4 \text{ mg/L}$. Trung bình ngày DO có giá trị khoảng $6,6 \text{ mg/L}$.

Giá trị pH trong cùng nghiệm thức và giữa các nghiệm thức tuy dao động nhưng không quá 1 đơn vị. Giá trị pH gần như không khác nhau giữa buổi sáng và buổi chiều và nằm trong khoảng $7,46 \pm 0,37$ (buổi sáng) và $7,44 \pm 0,49$ (buổi chiều).

Bảng 1: Nhiệt độ, DO, pH trong quá trình thí nghiệm (trung bình \pm SD)

Yếu tố	Nghiệm thức	Sáng	Chiều	TB ngày
Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	A	$24,81 \pm 1,25$	$27,23 \pm 1,24$	$26,02 \pm 1,74$
	B	$24,76 \pm 1,21$	$27,31 \pm 1,27$	$26,03 \pm 1,78$
	C	$24,72 \pm 1,25$	$27,22 \pm 1,26$	$25,97 \pm 1,77$
	D	$24,70 \pm 1,25$	$27,29 \pm 1,24$	$26,00 \pm 1,80$
	TB	$24,74 \pm 1,24$	$27,27 \pm 1,25$	$26,00 \pm 1,77$
DO (mg/L)	A	$6,83 \pm 0,61$	$6,39 \pm 0,59$	$6,61 \pm 0,64$
	B	$6,94 \pm 0,50$	$6,94 \pm 0,59$	$6,70 \pm 0,60$
	C	$6,73 \pm 0,54$	$6,21 \pm 0,69$	$6,47 \pm 0,67$
	D	$6,63 \pm 0,53$	$6,38 \pm 0,51$	$6,50 \pm 0,53$
	TB	$6,78 \pm 0,56$	$6,36 \pm 0,6$	$6,57 \pm 0,62$
pH	A	$7,30 \pm 0,39$	$7,35 \pm 0,49$	$7,33 \pm 0,44$
	B	$7,45 \pm 0,41$	$7,4 \pm 0,56$	$7,42 \pm 0,49$
	C	$7,54 \pm 0,31$	$7,45 \pm 0,48$	$7,50 \pm 0,41$
	D	$7,55 \pm 0,31$	$7,55 \pm 0,40$	$7,55 \pm 0,36$
	TB	$7,46 \pm 0,37$	$7,44 \pm 0,49$	$7,45 \pm 0,44$

3.1.2 Hoạt tính enzyme ChE trong quá trình thí nghiệm

Kết quả phân tích (Bảng 2) cho thấy hoạt tính của ChE giảm rất rõ theo sự gia tăng nồng độ diazinon. Sau 4 ngày cá sống trong dung dịch diazinon thì hoạt tính ChE giảm đáng kể so với đối chứng ($p < 0,05$). Ở nghiệm thức (B) hoạt tính ChE ở mức $7,38 \pm 0,82 \mu\text{mol/g/phút}$ tương đương 67,34% đối chứng, nghiệm thức (C) ở mức $2,05 \pm 0,27 \mu\text{mol/g/phút}$ (18,70% đối chứng), nghiệm thức (D) là $0,96 \pm 0,37 \mu\text{mol/g/phút}$ (8,76% đối chứng). Nói một cách khác, diazinon ức chế hoạt tính của ChE ở các nghiệm thức (B), (C), (D) lần lượt là 32,66%, 81,3% và 91,24%. Ở nghiệm thức (C) và (D) hoạt tính ChE gần như bị ức chế hoàn toàn. Ở thời điểm 20 ngày (16 ngày sau khi cho cá ra môi trường nước sạch) mặc dù hoạt tính ChE có phục hồi nhưng vẫn còn thấp hơn so với tình trạng bình thường ở đối chứng ($p < 0,05$).

Lần thứ hai khi cá tiếp xúc với diazinon trong 4 ngày thì hoạt tính ChE lại giảm đáng kể so với đối chứng ($p < 0,05$). So với lần tiếp xúc đầu tiên thì hoạt tính có thấp hơn (tính theo $\mu\text{mol/g/phút}$) nhưng nếu tính theo tỷ lệ so với đối chứng thì hoạt tính ChE ở các nghiệm thức (B), (C) và (D) lần lượt là 59,52%, 15,67% và 8,52%. Nói cách khác, ở lần tiếp xúc thứ 2 thì ChE bị ức chế ở các nghiệm thức (B), (C) và (D) lần lượt là 40,48%, 84,33%, 91,48%. Nhìn chung ở lần tiếp xúc thứ hai, cá vẫn có phản ứng sinh học tương tự như lần thứ nhất. Dù lần hai mức độ ức chế ở các nghiệm thức có ít hơn so với lần đầu nhưng hầu như sự ít hơn là rất nhỏ.

Sau lần tiếp xúc thứ 2, cá cũng được cho ra nước sạch và hoạt tính ChE được phục hồi dần theo thời gian. Thời gian sống trong nước sạch càng lâu thì hoạt tính ChE được phục hồi càng nhiều. Tuy nhiên, ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (60 ngày) chỉ có nghiệm thức (B) là hoạt tính ChE được phục hồi hoàn toàn ($p > 0,05$), các nghiệm thức còn lại thì hoạt tính ChE vẫn thấp hơn so với đối chứng ($p < 0,05$). Như vậy, diazinon gây ức chế hoạt tính ChE ở cá Lóc rất lâu dù cá đã sống trong môi trường nước sạch. Điều này cũng có nghĩa cá sẽ bị ảnh hưởng rất lâu đến hệ thống sinh học khi tiếp xúc với diazinon.

Bảng 2: Giá trị trung bình hoạt tính ChE qua các đợt thu mẫu

Nghiệm thức	Hoạt tính ChE ($\mu\text{mol/g/phút}$)				
	4 ngày	20 ngày	24 ngày	40 ngày	60 ngày
A	$10,96 \pm 1,50$	$9,94 \pm 0,92$	$9,51 \pm 0,86$	$8,97 \pm 1,17$	$10,03 \pm 1,80$
B	$7,38 \pm 0,82^*$ (32,66%)	$8,60 \pm 1,15^*$ (13,48%)	$5,66 \pm 0,51^*$ (40,48%)	$7,35 \pm 0,61^*$ (18,06%)	$9,50 \pm 0,66\text{ns}$ (5,28%)
C	$2,05 \pm 0,27^*$ (81,30%)	$6,67 \pm 0,94^*$ (32,90%)	$1,49 \pm 0,53^*$ (84,33%)	$6,71 \pm 0,62^*$ (25,20%)	$8,64 \pm 0,95^*$ (12,86%)
D	$0,96 \pm 0,37^*$ (91,24%)	$6,88 \pm 0,54^*$ (30,78%)	$0,81 \pm 0,21^*$ (91,48%)	$6,64 \pm 0,74^*$ (25,96%)	$8,46 \pm 0,95^*$ (15,65%)

Kết quả trình bày trung bình \pm SD. Dấu sao () chỉ sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$), ns chỉ không sai khác so với đối chứng, Mann-Whitney U test. Số liệu trong ngoặc đơn là tỷ lệ ức chế (%).*

3.1.3 Tăng trọng của cá Lóc trong quá trình thí nghiệm

Kết quả xem xét tốc độ tăng trưởng của cá (Bảng 3) trong thời gian thí nghiệm cho thấy diazinon làm giảm tăng trưởng ở hầu hết các nghiệm thức nhưng chỉ có nghiệm thức (D) là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$). Ở thời điểm 40 ngày, tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR) ở các nghiệm thức (A), (B) và (C) lần lượt là $0,67 \pm 0,5$,

0,62±0,43 và 0,59 ± 0,36%/ngày. Trong khi đó ở nghiệm thức (D) là 0,34%/ngày. Con số này chỉ bằng khoảng một nửa so với đối chứng. Tuy nhiên, ở thời điểm 60 ngày thì sự ức chế này được rút ngắn lại chỉ còn 33,33% (SGR bằng 66,67% so với đối chứng). Nhìn chung, mức độ ức chế tốc độ tăng trưởng ở thời điểm 60 ngày đã giảm.

Bảng 3: Giá trị trung bình về tốc độ tăng trưởng tương đối – Specific growth rate (SGR) của cá Lóc ở các nồng độ thuốc khác nhau

Nghiệm thức	SGR (%/ngày)	
	40 ngày	60 ngày
A	0,67 ± 0,50 (n = 51)	0,78 ± 0,36 (n = 36)
B	0,62 ± 0,43 (n = 50)	0,73 ± 0,31 (n = 35)
C	0,59 ± 0,36 (n = 44)	0,71 ± 0,21 (n = 29)
D	0,34 ± 0,41 (n = 48)*	0,52 ± 0,29 (n = 31)*

Kết quả trình bày trung bình ± SD. Trong cùng 1 cột, dấu sao (*) chỉ sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (p<0,05), Dunnett t (2-sided) test

3.1.4 Tỷ lệ chết của cá trong thời gian thí nghiệm

Dù chúng tôi không so sánh thống kê về tỷ lệ chết của cá sau khi kết thúc thí nghiệm nhưng qua bảng 4 cho thấy tỷ lệ chết (%) của cá gia tăng theo nồng độ diazinon. Nồng độ cao nhất (0,35mg/L) tỷ lệ chết cao gấp 3 lần so với đối chứng. Ngay cả ở nghiệm thức có nồng độ thấp nhất (B) thì tỷ lệ chết cũng cao gấp đôi so với đối chứng.

Bảng 4: Tỷ lệ chết (%) trung bình của cá Lóc ở các nghiệm thức trong thí nghiệm

Nghiệm thức	Tỷ lệ chết (%)	Độ lệch chuẩn
A	2,22	1,92
B	4,44	1,92
C	5,56	3,85
D	6,67	3,33

3.2 Thảo luận

Xu hướng nhiệt độ chênh lệch trong ngày thấp vào buổi sáng và cao vào buổi chiều trong nghiên cứu này (Bảng 1) không là hiện tượng bất thường. Nhiệt độ chịu ảnh hưởng chủ yếu từ bức xạ mặt trời hay cường độ chiếu sáng của mặt trời. Vào buổi sáng cường độ chiếu sáng thấp hơn buổi trưa nên nhiệt độ nước thấp vào buổi sáng (7-8 giờ) và cao vào 14-15 giờ. Toàn bộ hệ thống thí nghiệm bố trí trong mái che nên nhiệt độ khá ổn định, chênh lệch nhiệt độ tối đa khoảng 2.5°C. Theo Lee and Ng (1994) thì cá Lóc *C. striata* có thể sống ở nhiệt độ từ 11-40°C, phát triển tốt ở 20-30°C (Ngô Trọng Lư, 2002). Nhiệt độ trung bình ngày trong thí nghiệm khoảng 26°C là rất thích hợp cho cá Lóc sinh sống và phát triển.

Hệ thống thí nghiệm luôn được sục khí nên DO đảm bảo được khoảng 6,6 mg/L và dao động rất nhỏ (khoảng 0,4 mg/L). Ngưỡng cho phép DO lý tưởng cho các loài thủy sinh vật là 5 mg/L. Do đó DO trong thí nghiệm phù hợp cho cá Lóc sinh sống. Hơn thế nữa, cá Lóc loài hô hấp khí trời bắt buộc (Vivekanandan, 1977) nên có thể sống được ở điều kiện thiếu hụt DO. Trong thí nghiệm, cá được cho ăn bằng thịt cá tươi xay nhuyễn nên chắc chắn thức ăn phần nào sẽ hoà tan vào trong nước

mà không được cá sử dụng. Sự phân huỷ thức ăn này là nguyên nhân làm DO thấp vào buổi chiều.

Giá trị pH trong hệ thống thí nghiệm rất ổn định (Bảng 1), dao động rất nhỏ và nằm trong khoảng trung tính (7,5). Cá Lóc có khả năng chịu đựng được khoảng dao động pH rộng từ 4,25 – 9,4 (Lee and Ng, 1994). Sự dao động không lớn về pH là điều kiện lý tưởng cho cá Lóc sinh sống và phát triển. Tuy nhiên, pH nằm trong khoảng trung tính là điều kiện mà diazinon tồn tại lâu nhất hay chậm phân huỷ trong môi trường nhất (Tomlin, 1994). Do đó, ở pH này thì khả năng gây độc của diazinon cho cá có thể dài nhất.

Nhìn chung các yếu tố môi trường trong thí nghiệm nằm trong giới hạn sinh lý, sinh trưởng của cá Lóc *C. striata*. Sự ổn định các yếu tố pH, DO và nhiệt độ giữa các thí nghiệm thức sẽ làm cho thí nghiệm mang tính đồng nhất cao về mặt môi trường.

Hoạt tính enzyme ChE trong não cá Lóc bị ức chế rất nghiêm trọng so với đối chứng ($p < 0,05$) ngay sau 2 lần tiếp xúc với diazinon trong 4 ngày. Mức độ ức chế gia tăng theo sự gia tăng nồng độ diazinon. Kết quả trong thí nghiệm này cũng tương tự như phát hiện của Cong *et al.*, 2006 trên cá Lóc trưởng thành ($40,4 \pm 11,5$ g). Tổng hợp từ nhiều nghiên cứu, Aprea *et al.*, 2002 cho rằng ngưỡng giới hạn cho phép hoạt tính ChE bị ức chế không quá 30% so với bình thường. Như vậy, sau 4 ngày tiếp xúc (cả 2 lần) với diazinon, sự ức chế hoạt tính ChE ở tất cả các thí nghiệm thức có diazinon đã vượt quá mức cho phép. Một điều đáng lưu ý ở đây là lần tiếp xúc thứ 2 mức độ ức chế gần giống như lần đầu tiên. Có thể nói sau 1 lần tiếp xúc với diazinon có lóc chưa gia tăng hay giảm khả năng chịu đựng. Hay nói cách khác cá Lóc chưa thể hiện tính kháng với diazinon.

Sau khi cho cá ra môi trường nước sạch, hoạt tính ChE được phục hồi dần nhưng vẫn còn thấp đáng kể so với đối chứng ($p < 0,05$), ngoại trừ ở thí nghiệm thức B. Tương tự, Silva (1993) cho thấy hoạt tính ChE trong huyết tương cá *Callichthys callichthys* bị hoá chất BVTV gốc lân hữu cơ methyl parathion (ở nồng độ dưới mức gây chết) ức chế 90% sau 4 giờ tiếp xúc và duy trì mức này trong 4 ngày, sau đó khôi phục dần ở 8 – 10 ngày kế tiếp và đạt 80 – 90% mức bình thường sau 35 ngày. Ảnh hưởng của diazinon lên hoạt tính ChE trên cá Lóc trưởng thành ($40,4 \pm 11,5$ g) sau một lần tiếp xúc nhưng nước không được thay trong 30 ngày cũng cho kết quả tương tự (Cong *et al.*, 2006). Theo Tomlin (1994) thì diazinon có thời gian bán rã (DT50) dài nhất ở môi trường có pH trong khoảng trung tính. Có lẽ đây là nguyên nhân mà ChE không phục hồi đến mức bình thường trong thí nghiệm này. Tuy nhiên, vấn đề này cần được làm rõ hơn thông qua nghiên cứu khả năng giải độc hay đào thải diazinon ra khỏi cơ thể của cá Lóc.

Sự ức chế ChE lâu dài của diazinon lên cá Lóc có thể xem là một đánh dấu sinh học để chẩn đoán môi trường mà sinh vật sống có tồn tại hoá chất như diazinon. Ý tưởng này đã được đề nghị từ lâu (Coppage *et al.*, 1975; Peakall, 1992; Kirby *et al.*, 2000) nhưng chưa được áp dụng ở Việt Nam. Đánh dấu sinh học như đo hoạt tính ChE có thể dùng để chỉ môi trường từng có tồn tại hoá chất BVTV gốc lân hữu cơ hay carbamate đã được nhiều người đồng tình. Tuy nhiên, muốn ứng dụng đề nghị này cần phải chọn lựa sinh vật thích hợp cho từng khu vực. Sinh vật lựa chọn phải đáp ứng được một số tiêu chí như phân bố rộng, dễ thu mẫu, nhạy cảm

với hoá chất, ... (Peakall, 1992). Qua nghiên cứu này cho thấy hoạt tính ChE trong não cá Lóc rất nhạy cảm với diazinon, ngay cả nồng độ rất thấp (0,016 mg/L) cũng thấy sự khác biệt rất rõ so với trường hợp không có diazinon (đối chứng). Do đó, đo hoạt tính ChE trong não cá Lóc đồng *C. striata* có thể cho thấy cá đã sống trong môi trường có tồn tại hoá chất BVTV như diazinon.

Trong nghiên cứu này cho thấy cùng với sự ức chế ChE trong não, tăng trọng tương đối của cá Lóc cũng giảm đáng kể ở nồng độ 0,35 mg/L. Ở nồng độ này tăng trọng của cá đã giảm đi khoảng 50% so với đối chứng. Kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Thị Thanh Hương (1999) về ảnh hưởng diazinon (basudin 40 ND) lên tăng trọng của cá Chép, Rô Phi và Mè Vinh. Tương tự, basudin 40 ND cũng làm giảm tăng trọng của cá Trê Vàng dù ở nồng độ thấp nhất (nồng độ an toàn và chỉ dẫn) (Hồ Thị Thanh Tuyền, 1999).

Arunachalam và Palanichamy (1982) đã phát hiện loài cá có cơ quan hô hấp khí trời *Macropodus cupanus* tương tự như cá Lóc không giảm ăn nhưng giảm sinh trưởng khi sống trong nồng độ dưới ngưỡng gây chết của hoá chất carbaryl (carbamate) trong 26 ngày. Cùng với sự giảm tăng trọng, cá *Macropodus cupanus* gia tăng bài tiết để đào thải độc chất ra ngoài. Đây là nguyên nhân làm giảm tăng trọng cá *Macropodus cupanus* sau thời gian thí nghiệm. Rất tiếc trong nghiên cứu này không đo sản phẩm bài tiết của cá Lóc nhưng cũng có thể tăng trọng giảm ở nồng độ 0,35 mg/L là do cá đã sử dụng năng lượng cho thực hiện bài tiết độc chất hay giải độc thay vì dùng cho tăng trọng.

Cùng với hậu quả của sự ức chế hoạt tính ChE lâu dài như giảm tăng trọng, tỷ lệ sống sót của cá cũng giảm hay nói cách khác tỷ lệ chết của cá cũng gia tăng theo nồng độ diazinon (Bảng 4). Ở nghiệm thức D tỷ lệ cá chết cao gấp 3 lần so với đối chứng. Aprea *et al.*, 2002 tổng hợp kết quả từ nhiều nghiên cứu và cho thấy mức giới hạn cho phép ChE bị ức chế mà không làm ảnh hưởng đến sinh vật là không quá 30%. Trong thí nghiệm này, cá Lóc sau khi cho ra nước sạch mức độ ức chế trong khoảng nhỏ hơn hoặc bằng 30% nhưng cá vẫn chết ($6,67 \pm 3,33\%$ ở nồng độ 0,35 mg/L). Qua đó cho thấy hậu quả của sự ức chế hoạt tính ChE ở cá Lóc *C. striata* nghiêm trọng hơn nhiều loài sinh vật khác.

Tóm lại, trong các chỉ tiêu theo dõi, hoạt tính ChE là nhạy cảm nhất so với tăng trọng và tỷ lệ chết. Đo đạc hoạt tính ChE trong não có thể nhận ra cá Lóc bị ảnh hưởng ở nồng độ 0,016 mg/L trong khi đó nếu xem xét tốc độ tăng trưởng tương đối hay tỷ lệ chết thì không thấy rõ cá bị ảnh hưởng ở nồng độ này. Do đó, đo hoạt tính ChE có thể xem như một vết sinh học cho biết sinh vật đã bị ảnh hưởng bởi hoá chất basudin. Từ đó, đưa ra cảnh báo tiềm năng ảnh hưởng cho sinh vật trước khi nó bị ảnh hưởng nghiêm trọng hơn như giảm tăng trọng hay chết.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Hoạt chất diazinon của thuốc BVTV Basudin 50EC gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cá Lóc giống *C. striata*. Hoá chất này không những gây ức chế hoạt tính ChE trong não lâu dài mà còn làm giảm sinh trưởng và tỷ lệ sống của cá trong hệ thống thí nghiệm.

Diazinon làm giảm đáng kể hoạt tính ChE trong não cá Lóc sau 4 ngày tiếp xúc. Mức độ ảnh hưởng gia tăng khi gia tăng nồng độ diazinon. Hoạt tính này phục hồi dần sau khi cho cá ra nước sạch và thay nước hàng ngày. Tuy nhiên nó vẫn còn thấp hơn đối chứng sau 60 ngày thí nghiệm hay 36 ngày sống trong nước sạch ($p < 0,05$), ngoại trừ nồng độ thấp nhất.

Hoạt tính ChE trong não cá Lóc rất nhạy cảm với hoạt chất diazinon, giảm rõ rệt ngay ở nồng độ rất thấp 0,016 mg/L.

Hoá chất diazinon đã ức chế tốc độ sinh trưởng tương đối của cá Lóc. Tốc độ tăng trưởng ở nghiệm thức 0,35 mg/L ở thời điểm 40 ngày và 60 ngày chỉ bằng 50% và 67% đối chứng.

4.2 Đề nghị

Có thể xem hoạt tính ChE là một đánh dấu sinh học chỉ mức độ ô nhiễm hoá chất BVTV gốc lân hữu cơ như diazinon.

Nghiên cứu thêm một số loại thuốc BVTV khác thuộc gốc lân hữu cơ, carbamate, cúc tổng hợp... lên sinh vật ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

Hạn chế sử dụng basudin hoặc lựa chọn loại ít gây độc cho sinh vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Apra, C., Colosio, C., Mammone, T., Minoia, C., and Maroni, M., 2002. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *Journal of Chromatography B* 769, 191-219.
- Arunachalam, S., and Palanichamy, S., 1982. Sublethal effects of carbaryl on surfacing behaviour and food utilization in the air-breathing fish, *Macropodus cupanus*. *Physiology and Behavior* 29, 23-27.
- Berg, H. 2001. Pesticide use in rice and rice - fish farm in the Mekong Dalte. Vietnam. *Crop Protection* 20, 897-905.
- Bộ Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn, 2003. Danh mục thuốc Bảo vệ Thực Vật cho phép sử dụng ở Việt Nam.
- Cong, N.V., Phuong, N.T. and Bayley, M., 2006. Sensitivity of brain cholinesterase activity to diazinon (Basudin 50EC) and fenobucarb (Bassa 50EC) insecticides in the air-breathing fish *channa striata* (Bloch, 1793). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 5 (in press).
- Coppage, D. L., Mathews, E., Cook, G. H., and Knight, J., 1975. Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, O, O-dimethyl S-(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorothioate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5, 536.
- Đỗ Thị Thanh Hương, 1999. Ảnh hưởng của Basudin 50EC lên thay đổi chỉ tiêu sinh lí và huyết học của cá chép, cá rô phi, cá mè vinh. Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ thủy sản. Đại học Cần Thơ.
- Ellman, G. L., Courtney, D., Anderdres, V. J., and Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88-95.
- Hồ Thị Thanh Tuyền, 1999. Tìm hiểu ảnh hưởng của thuốc trừ sâu Basudin 50EC và Regent 800WG lên cá Lóc, sặc rằn và trê vàng. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư thủy sản. Đại học Cần Thơ.

- Kirby, M. F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S. J., Neall, P., Tylor, T., and Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 40 (9), 780-791.
- Lee, P. G., và Ng., P. K. L. 1994. The systematics and ecology of snakeheads (Pisces: Channidae) in peninsular Malaisia and Singapore. *Hydrologia* 285; 59-74.
- Murty, A. S. 1988. *Toxicity of pesticide to fish*. Volume II. CRC Press. Inc. Boca Raton.
- Ngô Trọng Lư, 2002. *Kỹ thuật nuôi cá quả, cá chình, chạch, bóng bớp, lươn*. Nhà Xuất Bản Hà Nội.
- Peakall, D., 1992. *Animal biomarkers as pollution indicators*. Chapman & Hall, London.
- Qin, J., He, X., and Fast, A. W., 1997. A bioenergetics model for an air-breathing fish, *Channa striatus*. *Environmental Biology of Fishes* 50, 309–318.
- Silva, H.C., Medina, H.G., Fanta, E., and Bacila, M., 1993. Sublethal effects of folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys*(Pisces: Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.*, 105 (2), 197-201.
- Tomlin, C. 1994. *The pesticide manual*. Crop Protection Publication.
- Trương Thủ Khoa và Trần Thị Thu Hương, 1993. *Định loại cá nước ngọt Vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long, Việt Nam*. Đại học Cần Thơ.
- Vivekanandan, E. 1977. Ontogenetic development of surfacing behaviour in the obligatory air - breathing fish *Channa (= ophiocephalus) striatus*. *Physiology and Behavior* 18,559-562.