

# ẢNH HƯỞNG NHIỆT ĐỘ VÀ OXY HÒA TAN LÊN ĐỘ TÍNH BASUDIN 50EC Ở CÁ LÓC (*Channa striata* BLOCH 1793)

Nguyễn Văn Công<sup>1</sup>, Trần Sỹ Nam<sup>1</sup>,  
Phạm Ngọc Thanh Hùng<sup>1</sup> và Nguyễn Thanh Phương<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*Effects of temperature (24, 30 & 34°C) and dissolved oxygen concentrations (DO) (<2mg/L & >5mg/L) on the inhibition of cholinesterase (ChE) activity of organophosphate Basudin 50EC (diazinon) on snakehead fish Channa striata fingerlings (18.47 ± 2.49g) were studied from May to November 2005. Experiments were randomly blocked designed in the laboratory with five replications. Enzyme ChE from brain, muscle and liver tissues were measured by the U-2800 spectrophotometer at 412 nm. The results showed that ChE activity was highest in brain, then muscle and lowest in liver. In the normal condition (uncontaminated water, without diazinon), temperature and DO do not affect ChE activity of snakehead fish. When fish were exposed to basudin, DO did not affect but temperature did affect significantly the ChE inhibition. ChE inhibition increased when temperature increased. The results indicated that the snakehead fish could be severely affected by basudin used in the ricefield.*

**Keywords:** Basudin, temperature, dissolved oxygen, Channa striata, cholinesterase, tissues

**Title:** Effects of temperature and dissolved oxygen on the toxicity of Basudin 50EC on snakehead fish (*Channa striata* Bloch 1793)

## TÓM TẮT

*Ảnh hưởng của nhiệt độ (24, 30 và 34°C) và DO (DO<2, DO>5mg/L) lên khả năng ức chế hoạt tính cholinesterase (ChE) của Basudin 50EC (diazinon) ở cá Lóc giống (Channa striata) có trọng lượng 18,47 ± 2,49g được thực hiện từ tháng 5/2005 đến tháng 11/2005. Ảnh hưởng hai nhân tố (DO và nhiệt độ) lên hoạt tính ChE ở các dạng mô (não, thịt và gan) được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên trong 6 giờ với 5 lần lặp lại. Hoạt tính ChE được đo bằng máy so màu quang phổ UV2800 ở 412 nm. Kết quả cho thấy hoạt tính ChE tập trung cao nhất trong não, kế đến là thịt và thấp nhất trong gan. Trong điều kiện bình thường thì nhiệt độ và DO không làm ảnh hưởng đến hoạt tính ChE. Trong môi trường có basudin thì DO không làm ảnh hưởng đến mức độ ức chế ChE mà chỉ có nhiệt độ làm ảnh hưởng mạnh đến sự ức chế này, nhiệt độ càng cao thì mức độ ức chế càng tăng (ngoại trừ gan). Kết quả cho thấy cá Lóc có nhiều nguy cơ bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi việc sử dụng basudin dưới điều kiện môi trường trên đồng ruộng.*

**Từ khoá:** Basudin, nhiệt độ, oxy hòa tan, Channa striata, cholinesterase, mô

## 1 GIỚI THIỆU

Các thông số môi trường nước như nhiệt độ và oxy hòa tan (DO) trên ruộng ở vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) biến động rất lớn trong ngày và trong suốt giai đoạn sinh trưởng của cây lúa. Nhiệt độ có thể ở mức 24- 25°C vào 6-7 giờ và đạt 34°C vào lúc 14-15 giờ và DO đôi lúc giảm dưới 2 mg/L vào sáng sớm (Vromant *et al.*, 2001a&b). Sự biến động này có thể làm cho sinh vật phải đối phó thường xuyên để tồn tại.

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

<sup>2</sup> Khoa Thủy Sản

Đồng ruộng, nơi sinh sống của nhiều loài thủy sinh vật như cá Lóc đồng (*Channa striata*), đã bị con người tác động nghiêm trọng. Từ việc tăng vụ canh tác trong năm đến việc sử dụng nhiều loại hóa chất để bảo vệ mùa màng. Ước tính có đến 30.000 tấn thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) sử dụng hàng năm trên đồng ruộng (Berg, 2001). Trong số đó có 1.151 tên thương phẩm với 266 tên hoạt chất khác nhau được phép lưu sử dụng (Bộ NN&PTNT, 2003). Basudin có hoạt chất gây hại là “diazinon” là thuốc BVTV thuộc gốc lân hữu cơ đã được bày bán phổ biến ở ĐBSCL, với nhiều tên thương phẩm và tỷ lệ phần trăm hoạt chất (Bộ NN&PTNT, 2003). Giống như đặc tính chung của thuốc BVTV gốc lân hữu cơ, dấu hiệu đầu tiên mà diazinon gây hại cho sinh vật là ức chế hoạt tính của enzyme cholinesterase (ChE) (Tomlin, 1994). Do đó đo đạc mức độ ức chế hoạt tính ChE có thể cho đánh giá được độc tính của hóa chất này. Enzyme ChE bao gồm cả acetylcholinesterase (AChE) và butyl cholinesterase (BuChE) (O'Brien, 1976). Cả AChE và BuChE đều rất nhạy cảm với hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ và carbamate (Peakal, 1992). Đo hoạt tính ChE được đề nghị là một chỉ tiêu đặc trưng đánh dấu sinh học chỉ sự ô nhiễm các loại hóa chất BVTV gốc lân hữu cơ và carbamate (Coppage *et al.*, 1975; Peakall, 1992, Kirby *et al.*, 2000).

Nhiều sinh vật sẽ tăng trao đổi chất khi nhiệt độ tăng (Qin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Lerman *et al.*, 2004). Sự gia tăng này nếu xảy ra trong môi trường có tồn tại hóa chất thì sẽ làm tăng độc tính của hóa chất đó (Jimenez *et al.*, 1987; Murty, 1988; Baer *et al.*, 2002; Tsui và Wang, 2004). Giống như phản ứng của sinh vật trong trường hợp nhiệt độ môi trường tăng, khi DO giảm thấp thì hầu hết sinh vật sẽ gia tăng khả năng lấy oxy cho nhu cầu cơ thể. Sự gia tăng có thực hiện qua tăng trao đổi nước qua mang, tăng hoạt động cơ quan hô hấp khí trời, tăng lượng hồng cầu, tăng ái lực hay khả năng gắn kết oxy với hồng cầu...(Jensen *et al.*, 1993). Hậu quả làm cho độc chất xâm nhập vào cơ thể nhiều hơn và gây độc nhanh hơn (Hoey *et al.*, 1991).

Với cá Lóc, những biến động lớn về DO và nhiệt độ trên đồng ruộng vùng ĐBSCL có làm tăng hay giảm tác hại từ việc phun thuốc BVTV lên chúng hay không chưa được rõ. Nghiên cứu này được triển khai nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của thay đổi nhiệt độ và DO lên hoạt tính cholinesterase trong các loại mô (não, gan và thịt) của cá Lóc ở trường hợp có diazinon và không có diazinon. Kết quả nghiên cứu góp phần hiểu thêm cơ hội sống còn của cá Lóc dưới những áp lực như thay đổi DO, nhiệt độ và sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật trên đồng ruộng.

## 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 11 năm 2005.

### 2.2 Hóa chất

Hoạt chất diazinon [6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl] ester có trong thuốc trừ sâu thương mại Basudin 50EC do Công ty BVTV An Giang sản xuất. Thuốc chứa 50% trọng lượng là hoạt chất và 50% trọng lượng còn lại là chất phụ gia.

### 2.3 Sinh vật thí nghiệm

Cá Lóc thí nghiệm có trọng lượng  $18,47 \pm 2,94$  g, chiều dài tổng  $13,17 \pm 0,75$  cm. Cá được ương nuôi từ cá bột, trong bể composite bằng nước máy. Hằng ngày cá được thay nước (50% thể tích) và cho ăn bằng trùng chỉ (*Tubifex sp* và *Limnodrilus sp*) khoảng 3 tháng và sau đó cho ăn bằng cá biển xay nhuyễn. Lượng thức ăn khoảng 3-5% trọng lượng cá. Cá thí nghiệm có độ tuổi khoảng 5 tháng, chưa mang trứng. Trước khi bố trí thí nghiệm ngưng cho ăn một ngày để hạn chế phân hoặc các chất thải khác của cá có thể làm ô nhiễm nước thí nghiệm và có thể làm ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm.

### 2.4 Bố trí thí nghiệm

Một mức nồng độ diazinon 0,35 mg/L pha từ Basudin 50EC được sử dụng để xem xét ảnh hưởng của nhiệt độ và oxy hòa tan đến khả năng ức chế hoạt tính ChE ở cá Lóc.

Ba mức nhiệt độ 24°C, 30°C, 34°C được chọn để xem có ảnh hưởng đến khả năng gây độc của diazinon hay không. Để có được nhiệt độ 24°C, dùng bể kính chứa sẵn nước để trong phòng máy lạnh 24 giờ. Để có được nhiệt độ 30°C và 34°C, nước trong bể kính sẽ được đun nóng bằng máy đun nước (Temperature-controller water bath, Germany) hoặc điện trở (Aquarium regler, Germany) có khả năng làm nóng trong khoảng 18-34°C.

Oxy hòa tan trong ruộng thấp thường xuất hiện vào sáng sớm (6-7 giờ) và đôi lúc ở nồng độ  $\leq 2$  mg/L và tăng dần đạt trên 10 mg/L vào 14-15 giờ (Vromant *et al.*, 2001a, b). Tuy nhiên, đa số các loài thủy sinh vật sẽ hoạt động bình thường ở mức DO  $\geq 5$  mg/L. Do đó, nghiên cứu của chúng tôi chỉ chọn mức DO  $\leq 2$  mg/L và trên 5 mg/L để bố trí thí nghiệm. Để làm giảm DO hòa tan trong nước, chúng tôi sử dụng khí nitơ cho vào nước (Hoey *et al.*, 1991; Baer *et al.*, 2002). Lượng khí nitơ cho vào nước được duy trì và điều khiển bằng valve điều khiển. Máy thổi khí dùng để đảm bảo DO trên 5 mg/L đối với nghiệm thức DO  $> 5$  mg/L.

DO và nhiệt độ nước được kiểm tra bằng máy Thermo Orion (Germany) trước khi bố trí thí nghiệm. Có thể DO và nhiệt độ sẽ dao động trong suốt thời gian thí nghiệm nhưng khoảng giao động sẽ không lớn. Chúng tôi sẽ ghi nhận DO và nhiệt độ mỗi giờ 1 lần bằng máy Thermo Orion.

Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên trong vòng 6 giờ. Mỗi nghiệm thức lập lại 5 lần, mỗi lần lập lại có 1 cá được cho vào bình tam giác 1000 mL đã chuẩn bị sẵn 700 mL dung dịch diazinon pha bằng nước máy và 1 cục đá bọt. Sau đó đặt bình tam giác vào bể kính hay temperature-control water bath đã chuẩn bị ở những mức nhiệt độ mong muốn. Như vậy, mỗi mức DO sẽ bố trí ở 3 mức nhiệt độ khác nhau hay mỗi mức nhiệt độ sẽ bố trí ở 2 mức DO khác nhau. Mẫu cá trong điều kiện không có thuốc cũng được bố trí đồng thời với nghiệm thức có thuốc để xem mức độ ức chế hoạt tính ChE.

### 2.5 Chuẩn bị mẫu và đo hoạt tính ChE

Sau 6 giờ thí nghiệm, cá ở từng nghiệm thức được bắt ra để riêng và giết ngay lập tức bằng nước đá. Sau đó dùng kéo và kẹp inox để lấy nguyên não, một phần gan và một phần cơ ra và cho vào ống tip nhựa 1,5 mL đã cân trước trọng lượng bằng

cân Sartorius (Germany) có độ chính xác 1mg. Quá trình này phải được thực hiện nhanh và sau đó trừ trên nước đá để hạn chế tối đa sự giảm hoạt tính ChE.

Từng mẫu mô được nghiền riêng biệt trong dung dịch đệm 0,1M phosphate pH 7,4 (chuẩn bị bằng cách pha trộn hóa chất  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merk) và  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merk) theo tỷ lệ nhất định) ở nồng độ mô là 25 mg/mL. Mẫu sau khi nghiền được ly tâm ở 4°C với tốc độ 2000 vòng/phút trong thời gian 20 phút bằng máy ly tâm Sigma (Germany).

Phần trong phía trên của mỗi mẫu sau khi ly tâm được sử dụng xem như nguồn enzyme. Hoạt tính ChE sẽ được đo theo phương pháp Ellman *et al.* (1961) bằng máy so màu quang phổ U2800 (HITACHI, Japan) ở bước sóng 412 nm trong vòng 200 giây. Kết quả sẽ được ghi nhận khi hệ số tương quan sau mỗi lần đo đạt từ 0.9 trở lên. Mỗi mẫu đo được chuẩn bị bằng cách cho 2,65 mL dung dịch đệm 0,1 M phosphate pH 7,4 vào cuvet nhựa, 0,1 mL 3 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Sigma-Aldrich, Germany), 0,05 mL 10mM acetylcholine iodide (Sigma-Aldrich, Germany). Sau đó cho vào 0,2 mL mẫu não đã ly tâm. Mẫu trắng giống như phần đã mô tả nhưng 0,2 mL mẫu được thay thế bằng dung dịch đệm 0,1M phosphate pH 7,4.

Hoạt tính ChE được tính theo công thức sau:

$$\text{Hoạt tính (HT)} = \frac{A \times C_v \times H_v}{F \times L \times S_v \times P_v}$$

Trong đó:

- HT là hoạt tính của enzyme ( $\mu\text{mole/g/phút}$ ),
- A là độ hấp phụ mẫu trong 1 phút (Abs/phút) – độ hấp phụ mẫu trắng (Abs/phút),
- $C_v$  là thể tích cuvet hay tổng thể tích dung dịch đo (mL),
- $H_v$  là thể tích dung dịch đệm 0,1 M phosphate pH 7,4 sử dụng để nghiền mẫu (mL),
- F là hệ số=13,6
- L là chiều dài cuvet (cm),
- $S_v$  là thể tích mẫu sau ly tâm lấy đo (mL),
- $P_v$  là trọng lượng mẫu lấy nghiền (g).

Tỷ lệ enzyme bị ức chế tính theo công thức sau:

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

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
- $A_o$  là hoạt tính ChE ở nghiệm thức đối chứng.

## 2.6 Xử lý số liệu

General Linear Model trong software SPSS được sử dụng để xem các nhân tố như DO và nhiệt độ có ảnh hưởng lên hoạt tính ChE hay không. Hoạt tính ChE của từng nhóm nghiệm thức được xử lý theo phương pháp thống kê phi tham số (Mann-Whitney U).

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả

Trong quá trình thí nghiệm, nhiệt độ ở nghiệm thức 24°C là  $24,0^{\circ}\text{C} \pm 0,28$ , ở 30°C là  $30,0^{\circ}\text{C} \pm 0,28$  và ở 34°C là  $34,1^{\circ}\text{C} \pm 0,13$ . Oxy hòa tan (DO) ở nghiệm thức <2 mg/L là  $1,57 \text{ mg/L} \pm 0,17$  và ở nghiệm thức >5 mg/L là  $6,84 \pm 0,74$  (Bảng 1). Mặc dù nhiệt độ và DO ở từng nghiệm thức có sự dao động, nhưng khoảng dao động này không lớn so với điều kiện yêu cầu.

#### 3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ và DO lên hoạt tính ChE trong các loại mô ở trường hợp không có diazinon

Khi cho cá sống 6 giờ trong 3 mức nhiệt độ và 2 mức DO của thí nghiệm thì chỉ có loại mô và DO ảnh hưởng đáng kể ( $p < 0,05$ ) đến hoạt tính ChE (Bảng 2). Nhiệt độ dù chênh lệch 10°C nhưng không là nguyên nhân gây khác biệt hoạt tính ChE ( $p > 0,05$ ). Sự tương tác cùng lúc giữa 2 nhân tố nhiệt độ và DO cũng không gây ảnh hưởng đến hoạt tính ChE ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 1: Bảng theo dõi nhiệt độ và DO trong quá trình thí nghiệm**

Điều kiện mong muốn của thí nghiệm	Điều kiện thực tế triển khai thí nghiệm
Nhiệt độ (oC)	
24	$24,0 \pm 0,28$
30	$30,0 \pm 0,28$
34	$34,1 \pm 0,13$
DO (mg/L)	
<2	$1,57 \pm 0,17$
>5	$6,84 \pm 0,74$

Số liệu trình bày giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD)

Qua xử lý thống kê (Bảng 2) cho thấy DO và nhiệt độ không ảnh hưởng đến hoạt tính ChE trong các loại mô ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, tương tác giữa DO và nhiệt độ thì ảnh hưởng đến hoạt tính ChE trong não ( $p = 0,013$ ).

**Bảng 2: Giá trị xác suất ‘P’ trong phân tích mô hình tổng quát (General linear model) xem xét ảnh hưởng của DO và nhiệt độ đến hoạt tính ChE trong các loại mô ở trường hợp không có diazinon**

Nguồn tác động	Não	Gan	Thịt
DO	0.158	0.197	0.133
Nhiệt độ	0.360	0.917	0.546
DO * nhiệt độ	0.013	0.369	0.563

Hoạt tính ChE trong não cao hơn trong thịt và trong gan ( $p < 0,05$ ) (Bảng 3). Hoạt tính ChE trong não đạt  $11,72 \pm 1,37 \mu\text{mole/g/phút}$  ở  $\text{DO} < 2$  và  $11,03 \pm 1,62 \mu\text{mole/g/phút}$  ở  $\text{DO} > 5$ . Trong thịt, hoạt tính ChE ở  $\text{DO} < 2$  và  $\text{DO} > 5$  lần lượt là  $7,40 \pm 1,32 \mu\text{mole/g/phút}$  và  $6,67 \pm 1,16 \mu\text{mole/g/phút}$ . Hoạt tính này chỉ bằng khoảng 63% hoạt tính trong não ở cùng DO. Gan có hoạt tính ChE thấp nhất, ở mức quanh  $1 \mu\text{mole/g/phút}$  ( $1,06 \pm 0,47 \mu\text{mole/g/phút}$  ở  $\text{DO} < 2$  và  $0,88 \pm 0,21 \mu\text{mole/g/phút}$  ở  $\text{DO} > 5$ ). Con số này chỉ bằng khoảng 9% hoạt tính trong não và 14% hoạt tính trong thịt.

**Bảng 3: Hoạt tính ChE trong các loại mô của cá Lóc sau 6 giờ sống ở các điều kiện nhiệt độ, và DO khác**

DO (mg/L)	Loại mô	Hoạt tính ChE ( $\mu\text{mole/g/phút}$ )			
		24°C	30°C	34°C	Trung bình(1)
<2	Não	11,09±0,80	12,50±2,07	11,57±0,56	11,72±1,37a
	Gan	1,25±0,83	0,98±0,07	0,96±0,11	1,06±0,47 c
	Thịt	6,78±1,08	7,39±1,53	8,03±1,28	7,40±1,32 b
>5	Não	12,50±1,92	10,26±0,83	10,33±0,84	11,03±1,62a
	Gan	0,78±0,21	0,93±0,26	0,93±0,16	0,88±0,21 c
	Thịt	6,61±1,47	6,76±1,29	6,63±0,94	6,67±1,16 b

Số liệu trình bày trung bình  $\pm$  (SD). Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau cùng các chữ a,b,c thì sai khác không có ý nghĩa ( $p>0,05$ ), Mann-Whitney U Test. <sup>(1)</sup> có n=15

### 3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ và DO lên hoạt tính ChE trong các loại mô ở điều kiện có diazinon

Kết quả (Bảng 4) cho thấy nhiệt độ đơn lẻ ảnh hưởng đến hoạt tính ChE trong mô não và thịt ( $p=0.00$ ) nhưng nó lại không ảnh hưởng đến hoạt tính ChE trong mô gan ( $p>0.05$ ). Oxy hòa tan và tương tác giữa DO và nhiệt độ không làm ảnh hưởng đến hoạt tính ChE trong tất cả các loại mô ( $p>0.05$ ).

**Bảng 4: Giá trị xác suất ‘P’ trong phân tích mô hình tổng quát (General linear model) xem xét ảnh hưởng của DO và nhiệt độ đến hoạt tính ChE trong các loại mô ở trường hợp có diazinon**

Nguồn tác động	Não	Gan	Thịt
DO	0.088	0.112	0.773
Nhiệt độ	0.000	0.762	0.000
DO * nhiệt độ	0.257	0.361	0.588

Nhiệt độ ảnh hưởng đến mức độ ức chế hoạt tính ChE trong các loại mô rất khác nhau (Bảng 5). Nhìn chung, nhiệt độ tăng sẽ làm tăng mức độ ức chế hoạt tính ChE trong não và thịt.

Trong não, khi nhiệt độ tăng từ 24°C lên 30°C và 34°C thì hoạt tính ChE giảm đi lần lượt là 2 lần và 2,7 lần so với ở 24°C ( $p<0,05$ ). Hoạt tính ChE tương ứng với 3 mức nhiệt độ 24°C, 30°C và 34°C là 7,20±0,84, 3,62±0,75 và 2,66±1,13  $\mu\text{mole/g/phút}$ .

Trong gan, khi nhiệt độ tăng từ 24°C lên 30°C và 34°C thì hoạt tính ChE hầu như không thay đổi ( $p>0,05$ ). Hoạt tính ChE tương ứng với 3 mức nhiệt độ 24°C, 30°C và 34°C là 0,52±0,10, 0,49±0,05 và 0,53±0,15  $\mu\text{mole/g/phút}$ .

Trong thịt, giống như trong não, khi nhiệt độ tăng từ 24°C lên 30°C và 34°C thì hoạt tính ChE giảm đi lần lượt là 1,63 lần và 2,09 lần so với ở 24°C ( $p<0,05$ ). Hoạt tính ChE tương ứng với 3 mức nhiệt độ 24°C, 30°C và 34°C là 4,09±0,74, 2,51±0,81 và 1,96±0,75  $\mu\text{mole/g/phút}$ .

Như vậy nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng ức chế hoạt tính ChE trong não và trong thịt theo cùng 1 xu hướng (nhiệt độ tăng, hoạt tính giảm) nhưng mức độ nhạy cảm của ChE trong não khi nhiệt độ tăng thì cao hơn trong thịt (trong não giảm từ 2-2,7

lần nhưng trong thịt chỉ giảm từ 1,63-2,09 lần so với hoạt tính ở 24°C). Trong gan, khi nhiệt độ thay đổi không làm ảnh hưởng đến khả năng ức chế hoạt tính ChE.

Dù xem xét hoạt tính ChE ở cột “trung bình” trong bảng 5 thấy không có khác biệt về mặt thống kê nhưng nếu chúng ta xem xét mức độ ức chế thì có sự khác biệt rất rõ. Chẳng hạn hoạt tính ChE trong thịt ở 24°C và trong não ở 30°C là giống nhau nhưng xem về mức độ ức chế thì rất khác nhau. Trong thịt ở 24°C chỉ bị ức chế khoảng 42% nhưng trong não ở 30°C thì mức độ ức chế lên đến 68%.

Tóm lại, khi nhiệt độ tăng từ 24°C, 30°C và 34°C thì hoạt tính ChE bị ức chế trong não lần lượt là 36,73%, 68,19% và 76,63%; trong thịt là 41,90%, 64,35% và 72,16%; trong gan là 46,39%, 49,49% và 45,36%.

**Bảng 5: Hoạt tính ChE trong các loại mô của cá Lóc sau 6 giờ sống trong dung dịch diazinon (0,35 mg/L) ở các mức nhiệt độ, và DO khác nhau**

Nhiệt độ (°C)	Loại mô	Hoạt tính ChE (µmole/g/phút)		
		DO<2	DO>5	Trung bình (2)
24	Não	7,21±1,19	7,18±0,41	7,20±0,84a 36,73%
	Gan	0,57±0,08	0,46±0,09	0,52±0,10e 46,39%
	Thịt	4,22±0,72	3,96±0,81	4,09±0,74b 41,90%
30	Não	3,05±0,49	4,20±0,46	3,62±0,75b 68,19%
	Gan	0,49±0,02	0,50±0,08	0,49±0,05e 49,49%
	Thịt	2,31±1,05	2,70±0,52	2,51±0,81cd 64,35%
34	Não	2,46±0,26	2,86±1,65	2,66±1,13c 76,63%
	Gan	0,58±0,18	0,48±0,10	0,53±0,15e 45,36%
	Thịt	1,91±0,81	2,00±0,77	1,96±0,75d 72,16%

Số liệu trình bày trung bình ±SD. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau cùng các chữ a, b, c, d, e thì sai khác không có ý nghĩa (p>0,05), Mann-Whitney Test. <sup>(2)</sup>có n=10. Số liệu phần trăm (%) trình bày tỷ lệ (%) ức chế so với mẫu đối chứng trong cùng loại mô.

### 3.4 Thời gian nghiền mẫu ở từng loại mô

Thời gian chuẩn bị mẫu để đo hoạt tính ChE phụ thuộc chủ yếu vào thời gian lấy mẫu, nghiền mẫu. Các công đoạn khác như ly tâm và đo mẫu thì như nhau (ly tâm trong 20 phút, đo trong 200 giây). Ở đây chúng tôi chỉ xem xét thời gian nghiền mẫu của từng loại mô khác nhau.

Kết quả ghi nhận cho thấy thời gian cần thiết để hoàn thành việc chuẩn bị một mẫu não trước khi ly tâm là khoảng 65 giây, gan khoảng 51 giây và thịt khoảng 160 giây (Bảng 6). Như vậy gan cần ít thời gian nhất, kế đến là não và lâu nhất là thịt (p<0,05).

**Bảng 6: Thời gian cần thiết để nghiên từng loại mô**

Loại mẫu	Thời gian nghiên (giây)	Độ lệch chuẩn
Não	64,83a	17,88
Gan	50,67b	7,51
Thịt	159,72c	35,78

Các giá trị cùng cột có cùng mẫu tự a,b,c theo sau thì sai khác không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ), Mann-Whitney Test,  $n=12$

### 3.5 Thảo luận

Trong điều kiện không có diazinon, nhiệt độ và DO trong thí nghiệm không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme ChE trong cả 3 loại mô. Kết quả này cũng trùng khớp với nghiên cứu của Cong *et al.* (2006). Nhiều thủy sinh vật ở vùng ôn đới thì nhiệt độ có liên quan đến hoạt tính ChE (Chuiko *et al.*, 1997). Lý do tại sao hoạt tính ChE ở cá Lóc không ảnh hưởng bởi nhiệt độ và DO chưa được rõ. Tuy nhiên, một lý do có thể nghĩ đến là ở vùng nhiệt đới dù nhiệt độ chênh lệch nhưng vẫn rất thấp so với vùng ôn đới nên không làm thay đổi hoạt tính ChE. Ngoài ra, cá Lóc (*C. striata*) là loài có cơ quan hô hấp khí trời nên khi DO giảm thấp nó sẽ chuyển sang sử dụng khí trời mà không gặp trở ngại nào. Các điều kiện thí nghiệm về DO và nhiệt độ trong nghiên cứu này nằm trong khoảng dao động ngoài tự nhiên (Vromant *et al.*, 2001a, b). Do đó, có thể cho rằng biến động nhiệt độ và DO trên đồng ruộng vùng ĐBSCL không làm ảnh hưởng đến hoạt tính ChE của cá Lóc. Tuy nhiên, trong thực tế còn nhiều nhân tố khác tác động đến như pH, độ kiềm, độ cứng, ... nên sự biến động ChE của cá Lóc theo mùa vụ trong tự nhiên cần được làm rõ.

Hoạt tính của ChE trong các loại mô cá Lóc có thể được sắp xếp não>thịt>gan. Nhiều loài sinh vật cũng có hoạt tính ChE trong não là cao nhất (Peakall, 1992). Như vậy kết quả này có thể cho ta sự lựa chọn loại mô hợp lý nhất để làm cơ sở cho việc nghiên cứu.

Hoạt tính ChE rất nhạy cảm với hóa chất bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ và carbamate và đã được đề nghị sử dụng làm đánh dấu sinh học chỉ sự ô nhiễm các hóa chất này (Coppage *et al.*, 1975; Peakall, 1992, Kirby *et al.*, 2000). Khi môi trường có tồn tại hóa chất bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ và carbamate thì ChE của sinh vật sẽ bị ức chế. Nếu chúng ta chọn loại mô có hoạt tính thấp như trong gan cá Lóc thì sau khi bị ức chế hoạt tính còn rất thấp. Hoạt tính thấp sẽ là một trở ngại trong quá trình đo đạc và dễ dẫn đến sai số. Do đó, với cá Lóc thì có thể đo hoạt tính ChE trong não hoặc thịt vẫn thuận tiện nhưng cần chú ý thêm đến thời gian cần thiết để chuẩn bị mẫu mà sẽ được thảo luận sau.

Ở nồng độ 0,35 mg/L, hoạt tính ChE bị ức chế từ 36,67% đến 76,63% (Bảng 5) tùy thuộc vào loại mô và nhiệt độ. Mức độ ức chế thấp nhất (ở 24°C) cũng vượt giới hạn cho phép để sinh vật hoạt động bình thường (Aprea *et al.*, 2002). Điều này cho thấy diazinon là nguy cơ đe dọa đến sự sống còn của sinh vật mà đặc biệt là cá Lóc khi sống trên ruộng. Đỗ Thị Thanh Hương (1999) cũng phát hiện hoạt tính ChE ở ba loài cá cá chép (*Cyprinus carpio* Linnaneus), rô phi (*Orreochromis niloticus* Linnaneus) và mè vinh (*Puntius gonionotus* Linnaneus) đều bị ức chế bởi hoạt chất diazinon trong Basudin 40EC, mức độ ức chế phụ thuộc vào nồng độ, thời gian tiếp xúc và từng loại cá khác nhau.



Nhiệt độ gia tăng làm gia tăng mức độ ức chế ChE của diazinon trong não và trong thịt hầu như gấp đôi so với ở 24°C. Như đã thảo luận, nhiệt độ gia tăng sẽ làm trao đổi chất tăng là nguyên nhân làm tăng tỷ lệ ức chế hoạt tính ChE của diazinon. Nhiều nghiên cứu cho thấy độc tính của hóa chất gia tăng khi nhiệt độ gia tăng. Tsui và Wang (2004) cho biết sự hấp thụ Hg<sup>2+</sup> và MeHg của giáp xác râu ngành *Daphnia magna* tăng 32% và 73% khi nhiệt độ tăng từ 14°C lên 24°C. Ở cá *Lepomis macrochirus*, sự hấp thụ hóa chất benzoapyrene ở 13°C thấp hơn ở 23°C là 5.8 lần (Jimenez *et al.*, 1987). Baer *et al.* (2002) cũng cho thấy rằng LC50-96h của thuốc trừ sâu profenofos trên cá Tuế giảm từ 333µg/L xuống còn 21,5µg/L khi thay đổi nhiệt độ và DO từ 20±2°C và 6-9mg/L sang 30±2°C và 1,5-3mg/L.

Bằng cách sử dụng mô hình hoá, Qin *et al.* (1997) cho thấy cá Lóc (*C. striata*) tăng trao đổi chất liên tục đến ngưỡng 38°C. Sự tăng cường trao đổi chất đồng nghĩa với nhu cầu oxy cho cơ thể tăng cao. Do đó, khi sinh vật tăng trao đổi chất chúng sẽ gia tăng trao đổi nước qua mang để lấy đủ oxy cho nhu cầu cơ thể. Đây là điều kiện làm cho diazinon hòa tan trong nước có nhiều cơ hội tiếp xúc với mang và xâm nhập vào cơ thể, sau đó gây hại qua ức chế hoạt tính ChE.

Tuy nhiên, ở gan thì nhiệt độ hầu như không ảnh hưởng đến mức độ ức chế ChE. Gan là cơ quan có chức năng quan trọng trong quá trình phân giải độc chất sau khi xâm nhập vào cơ thể. Nhiều loại enzyme có chức năng oxy hóa hay giải độc của đa số sinh vật đều do gan sản sinh ra. Có lẽ do gan không liên quan trực tiếp đến quá trình trao đổi chất, nó chỉ tham gia điều hòa lượng glucose, lipid và protid trong quá trình trao đổi chất, nên khi nhiệt độ gia tăng không làm gia tăng mức độ ức chế hoạt tính ChE.

Khi DO giảm thì hầu hết sinh vật sẽ gia tăng khả năng lấy oxy cho nhu cầu cơ thể. Sự gia tăng có thực hiện ở nhiều khía cạnh như tăng trao đổi nước qua mang, tăng hoạt động cơ quan hô hấp khí trời, tăng lượng hồng cầu, tăng ái lực hay khả năng gắn kết oxy với hồng cầu...(Jensen *et al.*, 1993). Sự tăng cường trao đổi chất có thể là cơ hội làm cho độc chất xâm nhập vào cơ thể nhiều hơn và gây độc nhanh hơn. Cá Lóc là loài hô hấp khí trời bắt buộc (Vivekanandan, 1977) nên khi oxy trong nước giảm (nghiệm thức DO<2) thì cá sẽ tăng cường lấy oxy từ khí trời. Hoạt động này sẽ làm hạn chế sự xâm nhập diazinon vào cơ thể. Mặc khác, do có cơ quan hô hấp khí trời nên cá có thể chuyển sang lấy oxy từ không khí là chủ yếu khi nhận ra môi trường có độc chất. Nghiên cứu của Natarajan (1981) cho thấy cá Lóc *C. striata* tăng cường lấy oxy từ không khí và giảm lấy oxy trong nước khi tiếp xúc với môi trường có hóa chất metasytox (hóa chất bảo vệ thực vật gốc lân hữu cơ). Tương tự, Arunachalam và Palanichamy (1982) cũng thấy loài cá có cơ quan hô hấp khí trời *Macropodus cupanus* tăng cường đón khí khi sống trong môi trường có carbaryl (hóa chất bảo vệ thực vật gốc carbamate). Trong nghiên cứu này có thể cá Lóc cũng tăng cường lấy oxy từ không khí và giảm lấy oxy trong nước khi nhận ra nước có diazinon. Đây có thể là nguyên nhân oxy không ảnh hưởng đến mức độ ức chế của diazinon đến hoạt tính ChE trong các loại mô.

Trong phân tích mẫu nói chung và ChE nói riêng, chuẩn bị mẫu rất quan trọng để có được kết quả thật sự đúng như nó đã có. Do đó việc nghiên cứu hết sức quan trọng để trích ra được hoàn toàn ChE. Trong thí nghiệm này tác giả không đi sâu

thảo luận thành phần của từng loại mô để giải thích tại sao thời gian nghiên khác nhau mà chỉ xoay quanh thời gian nghiền mẫu. Kết quả đã cho thấy nghiền một mẫu thịt mất thời gian nhiều gấp 3 lần nghiền một mẫu não hay gan (Bảng 6). Như đã thảo luận phần trước thì cả hai loại mô não và thịt đều có thể được chọn để phân tích ChE vì chứa hoạt tính cao hơn trong gan, dẫn đến ít sai số. Tuy nhiên, nghiền mẫu mô là thịt sẽ mất nhiều thời gian chuẩn bị mẫu hơn. Do đó, não có thể là loại mô phù hợp nhất cho nghiên cứu.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1 Kết luận

Hoạt tính ChE trong điều kiện bình thường thì tập trung nhiều nhất trong não kể đến là thịt và thấp nhất ở gan. Hoạt tính này không chịu ảnh hưởng bởi khoảng DO và nhiệt độ trong thí nghiệm.

Trong điều kiện oxy đầy đủ ( $DO > 5\text{mg/L}$ ) hay thiếu hụt ( $DO < 2\text{mg/L}$ ) thì không ảnh hưởng đến độc tính của diazinon lên cá Lóc.

Nhiệt độ là yếu tố làm ảnh hưởng mạnh đến độc tính của thuốc, khi nhiệt độ tăng thì làm tăng mức độ ức chế ChE trong não và trong thịt nhưng trong gan không thể hiện rõ.

### 4.2 Đề nghị

Có thể dùng hoạt tính ChE như là một đánh dấu sinh học chỉ môi trường bị ô nhiễm thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ như diazinon. Khi phân tích hoạt tính ChE nên chọn mô não làm cơ sở cho việc đánh giá.

Cần có những nghiên cứu thêm các yếu tố môi trường khác như: pH, chất rắn lơ lửng, độ kiềm, độ cứng lên độc tính của diazinon.

Nghiên cứu mở rộng trên nhiều đối tượng tôm, cá,... và trên những loại thuốc khác nhau để có cơ sở cho việc đánh giá độc tính của hóa chất này lên tài nguyên thủy 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.
- Baer, K.N., Oliver, K. and Pope, C.N., 2002. Influence of temperature and dissolved oxygen on the acute toxicity of profenofos to fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Drug and Chemical Toxicology* 25 (3), 232-245
- Berg, H. 2001. Pesticide use in rice and rice - fish farm in the Mekong Delta. Viet Nam. *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*, Vol. 25, No. 5 (in press).

- Coppage, D. L., Mathews, E., Cook, G. H., and Knight, J., 1975. Brain cholinesterase 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.
- Chuiko, G. M., Zhehin, Y., and Pod'gornaya, V. A., 1997. Seasonal fluctuation in brain ChE activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L.): A freshwater fish from Northwest Russia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117C (3), 251-257.
- 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 sỹ 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 cholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88-95.
- Hoey, T., Horberg, T.E. and Wichstrom, 1991. Inhibition of cholinesterase in rainbow trout following dichlorvos treatment at different water oxygen levels. *Aquaculture* 95, 33-40.
- Jensen, F.B., Nikinmaa M. and Weber R. E., 1993. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: J. Cliff Rankin and Frank B. Jensen (ed). 1993. *Fish Physiology*. Chapman and Hall (Fish and Fisheries series series 9).
- Jimenez, B.D., Cirimo, C.P., and McCarthy, J.F., 1987. Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology* 10, 41-57.
- 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.
- Lermen, C.L.L., Lappe, R., Crestani, M., Vieira, V.P., Gioda, C.R., Schetinger, M.R.C., Baldisserotto, B., Moraes, G. and Morsch, V.M., 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 239, 497-507.
- Liu, J., Cui, Y. and Liu, J., 2000. Resting metabolism and heat increment of feeding in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and Chinese snakehead (*Channa argus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 127, 131-138.
- Murty, A. S. 1988. Toxicity of pesticide to fish. Volume II. CRC Press. Inc. Boca Raton.
- Natarajan, G. M., 1981. Changes in the bimodal gas exchange and some blood parameters in the air-breathing fish, *Channa striatus* (Bleeker) following lethal (LC50-48h) exposure to metasystox (demeton). *Current Science* 50 (1), 40-41.
- O'Brien, R. D., 1976. Cholinesterase and its inhibition. In: Wilkinson, C. F (Ed.), 1976. *Insecticide biochemistry and physiology*. Heyden, London, pp. 271-296.
- 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.
- Tomlin, C. 1994. *The pesticide manual*. Crop Protection Publication.
- Tsui, M.T.K. and Wang, W.X., 2004. Temperature influences on the accumulation and elimination of mercury in a freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 70, 245-256.
- Vivekanandan, E. 1977. Ontogenetic development of surfacing behaviour in the obligatory air-breathing fish *Channa* (= *ophiocephalus*) *striatus*. *Physiology and Behavior* 18, 559-562.
- Vromant N, Chau NTH, Ollevier F. 2001 (a). The effect of rice seeding rate and fish stocking on the floodwater ecology of the rice field in direct-seeded, concurrent rice-fish systems. *Hydrobiologia* 445: 151-164.

Vromant N, Chau NTH, Ollevier F. 2001 (b). The effect of rice seeding rate and fish stocking on the floodwater ecology of the trench of a concurrent, direct-seeded rice-fish system. *Hydrobiologia* 547: 105-117