

# ẢNH HƯỞNG CỦA THUỐC TRỪ SÂU HOẠT CHẤT QUINALPHOS ĐẾN ĐỘ NHẠY CẢM CỦA MEN CHOLINESTERASE VÀ MỘT SỐ CHỈ TIÊU SINH LÝ CỦA CÁ CHÉP (*CYPRINUS CARPIO*)

Nguyễn Quang Trung<sup>1</sup> và Đỗ Thị Thanh Hương<sup>2</sup>

## ABSTRACT

*A study was conducted in Department of Aquatic nutrition and products processing, College of Aquaculture and Fisheries from January to May of 2011. The study consisted of two experiments. The first experiment was determination of sensibility of Cholinesterase (ChE) on common carp exposed to quinalphos at different concentrations. The treatments were 0, 0.0076, 0.076, 0.152, 0.380 and 0.57 mg/L, 3 replicates for each concentration, 30 fish per 100 L-composite, and for 96 hrs. The brain ChE activity significantly decreased after 96 hrs. at tested concentrations if compared to control. ChE activity had no signal of recovery after 96 hrs. The second experiment was determination of physiological parameters of common carp in conditions of direct exposure to quinalphos and contaminating in 24 hrs. before experimental design. The treatments were 0, 0.076, 0.152, 0.380 and 0.57 mg/L, 6 replicates for each concentration, 2 fish per 2 L-glass pot (oxygen consumption experiment) and 4 fish per 2 L-glass pot (oxygen threshold experiment). The results indicated that oxygen consumption and threshold significantly increased ( $p < 0.05$ ) in direct application condition. In contaminated condition, oxygen consumption tended to decrease, however there was no significant difference ( $p > 0.05$ ). Meanwhile, oxygen threshold had a tendency to increase significantly ( $p < 0.05$ ) with increased concentration. The results indicated that brain ChE activity was very sensitive to very low concentration of quinalphos (in 0.0076 mg/L, ChE inhibition of 23.%). The study showed that level of ChE inhibition of common carp can be used as a biomarker for pollution of organophosphate pesticides*

**Keywords:** *Quinalphos, Cyprinus carpio, cholinesterase, biomarker*

**Title:** *The effects of quinalphos on sensibility of cholinesterase and physiological parameters in common carp (Cyprinus carpio)*

## TÓM TẮT

*Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Dinh dưỡng và Chế biến Thủy sản-Khoa Thủy sản Đại học Cần Thơ từ tháng 02 đến tháng 5 năm 2011. Nghiên cứu gồm hai thí nghiệm. Thí nghiệm một là xác định độ nhạy cảm ChE của cá chép khi tiếp xúc với các nồng độ quinalphos khác nhau. Thí nghiệm được thực hiện với 6 nồng độ là 0; 0,0076 0,076; 0,152; 0,380 và 0,57 mg/L, mật độ cá là 30 con/bể composite 100 L nước, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần và thời gian thí nghiệm là 96 giờ. Kết quả thí nghiệm cho thấy hoạt chất quinalphos làm giảm có ý nghĩa hoạt tính ChE ở não ( $p < 0,05$ ) ở các nồng độ thuốc. Hoạt tính ChE ở não không có dấu hiệu phục hồi hoàn toàn sau 96 giờ. Thí nghiệm hai là xác định tiêu hao oxy và ngưỡng oxy của cá chép khi bổ trí thuốc trực tiếp vào hệ thống và gây nhiễm 24 giờ trước khi bố trí. Thí nghiệm được thực hiện với 5 nồng độ là 0; 0,076; 0,152; 0,380 và 0,57 mg/L. Cá được cho vào bình kín (2 con/bình) 2 L (tiêu hao oxy) và 4 con/bình kính 2 L (ngưỡng oxy), mỗi nồng độ được lặp lại 6 lần. Kết quả cho*

<sup>1</sup> Chi cục Thủy sản Cần Thơ

<sup>2</sup> Khoa Thủy sản - Đại học Cần Thơ

thấy tiêu hao oxy và ngưỡng oxy của cá tăng có ý nghĩa thống kê theo nồng độ ( $p < 0,05$ ) khi bố trí thuốc trực tiếp. Trong điều kiện gây nhiễm, tiêu hao oxy của cá có chiều hướng giảm nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), trong khi ngưỡng oxy có khuynh hướng tăng có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) theo nồng độ. Kết quả nghiên cứu cho thấy ChE ở não cá chép rất nhạy cảm khi tiếp xúc với hoạt chất quinalphos dù nồng độ rất thấp (nồng độ 0,0076 mg/L, ChE bị ức chế 23,5%), vì vậy có thể dùng làm chỉ thị cho sự ô nhiễm thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ.

**Từ khóa:** *Quinalphos, cá chép (Cyprinus carpio), cholinesterase, chỉ thị.*

## 1 GIỚI THIỆU

Thuốc trừ sâu được sử dụng ngày càng phổ biến trong sản xuất lúa để không chế dịch hại và duy trì năng suất lúa. Nông dân ở ĐBSCL có quan niệm sử dụng càng nhiều thuốc BVTV thì năng suất lúa càng cao, trong đó thuốc trừ sâu nhóm carbamate và lân hữu cơ được nông dân ĐBSCL sử dụng phổ biến kể đến là nhóm cúc tổng hợp (Heong *et al.*, 1998; Berg, 2001). Theo Rodrigues *et al.* (2001), thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ là nhóm thuốc trừ sâu quan trọng nhằm kiểm soát sâu bọ, côn trùng, được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp.

Thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos thuộc gốc lân hữu cơ có nhiều tên thương mại khác nhau như DDV Quin 25EC, Kinalux 25EC, Methink 25EC, Peryphos 25EC, Quiafos 25EC, Quilux 25EC, Quintox 25EC,... trong đó Kinalux 25EC là một trong những loại thuốc trừ sâu sử dụng phổ biến hiện nay có hiệu lực cao, trừ nhiều sâu hại như nhện gié, sâu phao, sâu đục bẹ, sâu cuốn lá trên lúa. Theo Chebbi *et al.* (2009), thuốc trừ sâu quinalphos (gốc lân hữu cơ) được sử dụng khá phổ biến trong canh tác nông nghiệp.

Cá chép (*Cyprinus carpio*) là một trong những đối tượng nuôi phổ biến nhất trong ruộng lúa ở thành phố Cần Thơ (Phan Văn Thành, 2008). Nguyễn Văn Hào *et al.* (2001), cho rằng nông dân thường sử dụng nông dược vào giữa giai đoạn 30-60 ngày khi cá trong ruộng lúa. Trong khi đó, một số nông dân phun thuốc trừ sâu không đúng cách dẫn đến cá chép có thể bị ảnh hưởng bởi thuốc trừ sâu trên đồng ruộng.

Độc tính của nhóm lân hữu cơ được thể hiện qua sự ức chế men acetylcholinesterase (AChE) được gắn kết với chất dẫn truyền thần kinh là acetylcholine từ đó ngăn cản việc dẫn truyền thần kinh ở động vật (Murphy, 1986). Ảnh hưởng chủ yếu của quinalphos và các nhóm lân hữu cơ khác lên sinh vật là ức chế hoạt tính men AChE, từ đó làm tê liệt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine ở các khớp thần kinh (Pan and Dutta, 1998).

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos đến độ nhạy cảm của men ChE và một số chỉ tiêu sinh lý ở cá chép (*Cyprinus carpio*).

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Dinh dưỡng và Chế biến Thủy sản, Khoa Thủy sản - Đại học Cần Thơ từ tháng 02/2011 đến tháng 05/2011.

## 2.2 Cá thí nghiệm

Cá chép (có nguồn gốc Việt), khối lượng 8-12 g được thu mua từ trại cá giống trên địa bàn thành phố Cần Thơ. Cá được thuần dưỡng trong bể composite 2m<sup>3</sup> trước khi bố trí thí nghiệm trong 14 ngày.

## 2.3 Thuốc thí nghiệm

Thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos có gốc lân hữu cơ với tên thương mại là Kinalux 25 EC, được sản xuất bởi Công ty thuốc bảo vệ thực vật An Giang. Kinalux 25EC chứa 25% hoạt chất quinalphos.

## 2.4 Nguồn nước thí nghiệm

Sử dụng nguồn nước máy thành phố, nước được bơm vào các bể thí nghiệm, sục khí liên tục 48 giờ trước khi bố trí thí nghiệm.

## 2.5 Thức ăn cho cá

Trong thời gian thuần dưỡng cá, cho cá ăn thức ăn viên nổi Cargill có hàm lượng đạm 30%, cho ăn 2 lần/ngày, lượng cho ăn theo nhu cầu (cho ăn đến khi cá không thể ăn được nữa). Ngừng cho ăn 1 ngày trước khi bố trí cá vào bể thí nghiệm.

## 2.6 Bố trí thí nghiệm

### 2.6.1 Thí nghiệm xác định độ nhạy cảm ChE của cá chép khi tiếp xúc với quinalphos

Thí nghiệm được bố trí 6 nghiệm thức là đối chứng, 1%, 10%, 20%, 50% và 75% giá trị LC<sub>50-96</sub> giờ. Giá trị LC<sub>50-96</sub> giờ của quinalphos đối với cá chép là 0,76 mg/L (Nguyễn Quang Trung và Đỗ Thị Thanh Hương, 2012). Mỗi nghiệm thức được lập lại 3 lần. Bố trí 30 cá/bể composite 100 lít nước. Thời gian thí nghiệm là 96 giờ. Các bể được sục khí nhẹ, không cho ăn và không thay nước.

Thu mẫu ở các thời điểm: 0 (trước khi bố trí thuốc), 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 và 96 giờ sau bố trí thuốc. Thu mẫu nhằm để xác định độ nhạy cảm của hoạt tính men ChE. Các chỉ tiêu môi trường như nhiệt độ, pH, oxy được đo hằng ngày.

### 2.6.2 Thí nghiệm xác định các chỉ tiêu sinh lý của chép khi tiếp xúc với quinalphos

#### Tiêu hao oxy

Thí nghiệm được bố trí 5 nghiệm thức là đối chứng, 10%, 20%, 50% và 75% giá trị LC<sub>50-96</sub> giờ. Mỗi nghiệm thức được lập lại 6 lần. Bố trí 2 cá/bình kín 2 lít.

Bố trí thuốc theo 2 hình thức: Bố trí thuốc trực tiếp vào hệ thống và bố trí gây nhiễm. Đối với trường hợp gây nhiễm, bố trí thuốc vào bể composite 500 lít trong 24 giờ, sau đó cá được bố trí vào hệ thống nước sạch hoàn toàn để xác định tiêu hao oxy.

Hệ thống thí nghiệm được bố trí nước chảy tuần hoàn qua các bình kín nhằm giúp ổn định nhiệt độ và oxy hòa tan trong 1 giờ. Bố trí cá vào bình, tiếp tục chạy tuần hoàn trong 30 phút. Sau đó bố trí thuốc trực tiếp vào hệ thống thí nghiệm tương ứng với các nồng độ và chạy tuần hoàn trong 30 phút. Tiến hành thu mẫu nước để xác định hàm lượng oxy ban đầu, sau 15 phút thu mẫu để xác định hàm lượng oxy cuối (Lần 1). Tiếp tục thực hiện lần 2, 3 tương tự như lần 1, tiêu hao oxy của cá là giá trị trung bình của 3 lần thực hiện.

Tiêu hao oxy của cá được tính toán theo công thức (Đỗ Thị Thanh Hương, 1997):

$$THO \text{ (mgO}_2\text{/kg/giờ)} = (O_{2d} - O_{2c}) * (V_b - V_c) / P_c * T$$

Trong đó:

$O_{2d}$  = Hàm lượng Oxy trong nước trước thí nghiệm

$O_{2c}$  = Hàm lượng Oxy trong nước cuối thí nghiệm

$V_b$  = Thể tích bình dùng làm thí nghiệm

$V_c$  = Thể tích cá dùng làm thí nghiệm

$P_c$  = Trọng lượng cá thí nghiệm

$T$  (giờ) = Thời gian thí nghiệm

### Ngưỡng oxy

Thí nghiệm được bố trí 5 nghiệm thức là đối chứng, 10%, 20%, 50% và 75% giá trị  $LC_{50}$ -96 giờ. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 6 lần. Bố trí 4 cá/bình kín 2 lít. Hệ thống thí nghiệm và cách bố trí thuốc tương tự như thí nghiệm xác định tiêu hao oxy. Ngưỡng oxy được xác định bằng phương pháp bình kín. Theo dõi khi thấy 50% cá trong bình chết, tiến hành thu mẫu nước để đo hàm lượng oxy, đó chính là ngưỡng oxy của cá.

## 2.7 Phương pháp phân tích mẫu

### 2.7.1 Phương pháp thu mẫu và Phân tích hoạt tính men cholinesterase (ChE)

Não cá sau khi thu được cho vào eppendofit 0,5 ml và trữ ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi phân tích. Khi phân tích hoạt tính men ChE, não được giải đông và nghiền bằng máy nghiền trong 1 ml dung dịch đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH = 7,5) trong điều kiện lạnh, thêm 0,5 ml dung dịch đệm để duy trì độ lạnh và thêm 0,5 ml dung dịch đệm để tráng máy nghiền. Chuyển dung dịch vừa mới nghiền sang eppendofit 1,5 ml để tiến hành ly tâm ở điều kiện  $4^{\circ}\text{C}$ , vận tốc 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, hút lấy phần nước trong nổi ở trên và trữ trong eppendofit 0,5 ml ở  $-80^{\circ}\text{C}$  cho đến khi phân tích hoạt tính men ChE.

Hoạt tính của ChE được xác định theo phương pháp Ellman *et al.* (1961), đo bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 412 nm trong 3 phút. Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Lowry *et al.* (1951).

### 2.7.2 Phân tích hàm lượng oxy hòa tan:

Oxy hòa tan được xác định bằng phương pháp Winkler.

## 2.8 Xử lý thống kê

Các số liệu trung bình của các nghiệm thức được tính toán bằng Microsoft Excel 2003. So sánh trung bình giữa các nghiệm thức được dựa vào phép phân tích phương sai ANOVA (một và hai nhân tố) và phép thử DUNCAN với mức ý nghĩa  $p < 0,05$  bằng phần mềm SPSS 11.5

## 3 KẾT QUẢ

### 3.1 Các yếu tố môi trường trong thời gian thí nghiệm

Biến động các yếu tố môi trường được trình bày ở bảng 1. Kết quả cho thấy các yếu tố môi trường ít biến động giữa các nghiệm thức trong thời gian thí nghiệm.

Giá trị pH trung bình vào buổi sáng là  $6,8 \pm 0,1$  và buổi chiều là  $6,9 \pm 0,1$ . Nhiệt độ bình quân vào buổi sáng là  $25,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$  và buổi chiều là  $26,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Hàm lượng oxy ở các nghiệm thức luôn duy trì trên 5 mg/L, dao động từ 5,9-6,3 mg/L. Các yếu tố môi trường trong thời gian thí nghiệm là ổn định và đồng nhất giữa các nghiệm thức, không ảnh hưởng đến hoạt tính men ChE.

**Bảng 1: Biến động các yếu tố môi trường trong thời gian thí nghiệm**

Yếu tố	Nồng độ (mg/L)	ĐC	0,0076	0,076	0,152	0,38	0,57	TB
pH	Sáng	7,0±0,1	6,9±0,1	6,8±0,1	6,8±0,1	6,8±0,2	6,7±0,2	6,8±0,1
	Chiều	6,9±0,1	6,8±0,1	6,9±0,1	6,8±0,1	6,9±0,1	6,8±0,1	6,9±0,1
Nhiệt độ (°C)	Sáng	25,4±0,1	25,4±0,3	25,4±0,2	25,3±0,2	25,4±0,2	25,3±0,2	25,4±0,1
	Chiều	26,9±0,2	27,0±0,1	27,0±0,6	26,7±0,1	26,9±0,1	26,9±0,1	26,9±0,1
Oxy (mg/L)	Sáng	6,2±0,5	6,3±0,6	6,1±0,5	6,3±0,3	6,0±0,3	5,9±0,2	6,1±0,2
	Chiều	6,2±0,7	6,0±0,4	6,0±0,3	6,1±0,6	5,9±0,1	5,9±0,1	6,0±0,1

Số liệu trình bày trung bình ± độ lệch chuẩn

### 3.2 Thí nghiệm xác định độ nhạy cảm ChE của cá chép khi tiếp xúc với quinalphos

Ảnh hưởng của quinalphos đến độ nhạy cảm ChE ở não được trình bày ở bảng 2. Kết quả thí nghiệm cho thấy, hoạt tính ChE ở não rất nhạy cảm với thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos sau 96 giờ.

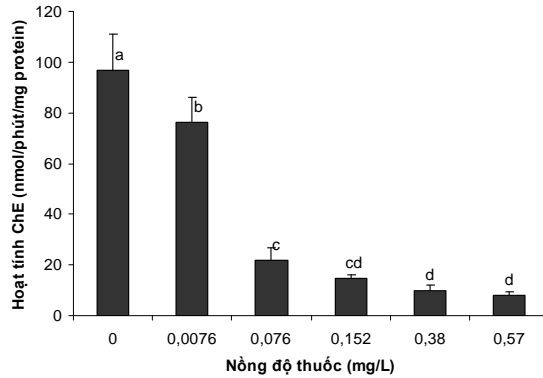
Mức độ ức chế ChE tăng theo sự gia tăng của nồng độ thuốc. Hoạt tính ChE bị ức chế ở tất cả các nồng độ thuốc và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ( $p < 0,05$ ). Ở nồng độ thấp nhất 0,0076 mg/L, mức độ ức chế là 23,5% tương đương hoạt tính ChE là 76,5%. Mức độ ức chế ChE cao nhất ở nồng độ 0,57 mg/L là 91,9% tương đương hoạt tính ChE là 8,1%.

**Bảng 2: Ảnh hưởng của quinalphos lên hoạt tính ChE ở não sau 96 giờ**

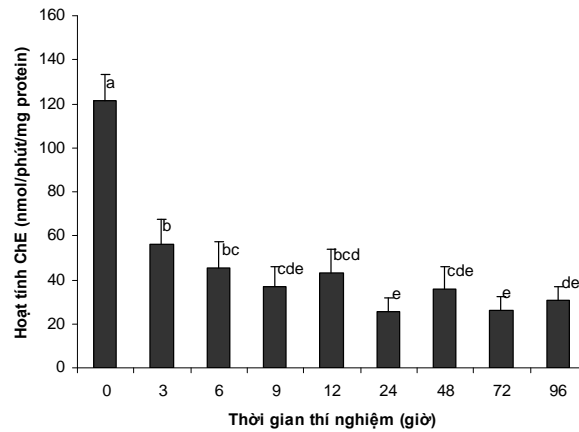
Nồng độ (mg/L)	Hoạt tính ChE (nmol/phút/mg protein)
0	96,83±14,39
0,0076	76,49±9,71
0,076	22,07±4,87
0,152	14,68±1,18
0,38	9,87±2,22
0,57	8,14±1,43
Thời gian (giờ)	
0	121,36±12,06
3	56,24±11,25
6	45,65±11,38
9	36,72±9,47
12	43,13±10,82
24	25,76±5,91
48	35,82±10,28
72	26,24±5,86
96	30,47±6,48
<b>P value</b>	
<b>Nồng độ</b>	0,00
<b>Thời gian</b>	0,00
<b>Nồng độ x Thời gian</b>	0,12

Số liệu trình bày trung bình ± Sai số chuẩn (SE)

Trong khi đó, hoạt tính ChE bị ức chế có ý nghĩa sau 3 giờ thí nghiệm. Hoạt tính ChE có xu hướng giảm có ý nghĩa thống kê theo sự gia tăng nồng độ thuốc. Hoạt tính ChE không có dấu hiệu phục hồi hoàn toàn sau 96 giờ thí nghiệm ( $p < 0,05$ ). Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt về nồng độ ( $p < 0,05$ ) (hình 1) và thời gian ( $p < 0,05$ ) (hình 2). Tuy nhiên, không có sự tương tác giữa nồng độ thuốc và thời gian (nồng độ x thời gian) ( $P \text{ value} > 0,05$ ).



Hình 1: Biến đổi hoạt tính ChE theo nồng độ thuốc

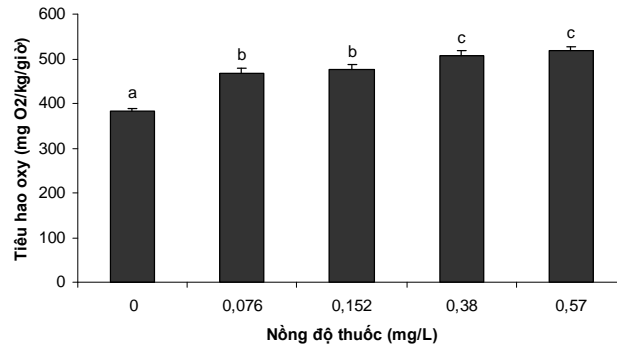


Hình 2: Biến đổi hoạt tính ChE theo thời gian

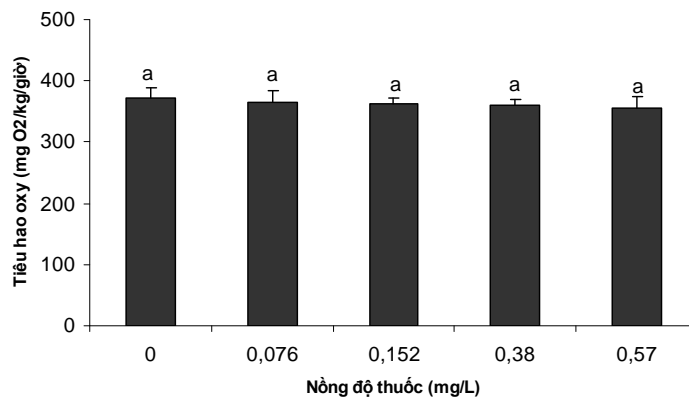
### 3.3 Thí nghiệm xác định các chỉ tiêu sinh lý của cá chép khi tiếp xúc với quinalphos

Ảnh hưởng của thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos đến tiêu hao oxy của cá chép được trình bày ở hình 3 và 4. Kết quả cho thấy trong điều kiện bố trí thuốc trực tiếp, tiêu hao oxy của cá có xu hướng tăng theo nồng độ thuốc, dao động từ 382-518 mg O<sub>2</sub>/kg/giờ. Sự biến động này khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ( $p < 0,05$ ). Trong điều kiện gây nhiễm, tiêu hao oxy của cá có chiều hướng giảm theo sự gia tăng nồng độ thuốc, dao động 356-371 mg O<sub>2</sub>/kg/giờ và sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Khi so sánh điều kiện bố trí thuốc trực tiếp và gây nhiễm cho thấy tiêu hao oxy của cá khi bố trí trực tiếp cao hơn nhiều và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với trong điều kiện gây nhiễm ( $p < 0,05$ ) (Bảng 3).



Hình 3: Tiêu hao oxy (mg O<sub>2</sub>/kg/giờ) của cá chép trong điều kiện bố trí thuốc trực tiếp



Hình 4: Tiêu hao oxy (mg O<sub>2</sub>/kg/giờ) của cá chép trong điều kiện gây nhiễm

Bảng 3: Tiêu hao oxy của cá chép khi tiếp xúc với quinalphos

Nồng độ thuốc (mg/L)	Tiêu hao oxy (mg O <sub>2</sub> /kg/giờ)	
	Bố trí trực tiếp	Bố trí gây nhiễm
0	382,13±7,73 <sup>aA</sup>	371,47±16,66 <sup>aA</sup>
0,076	468,19±10,32 <sup>aA</sup>	364,70±19,69 <sup>bB</sup>
0,152	477,27±9,13 <sup>aA</sup>	362,37±9,20 <sup>bB</sup>
0,38	508,43±10,54 <sup>aA</sup>	359,20±10,87 <sup>bB</sup>
0,57	517,98±8,70 <sup>aA</sup>	355,57±18,29 <sup>bB</sup>

Các giá trị trình bày số trung bình±độ lệch chuẩn

Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a,b) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

Các giá trị trong cùng một hàng cùng mẫu tự (A, B) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

Ảnh hưởng của thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos đến ngưỡng oxy của cá chép được trình bày ở bảng 4. Kết quả cho thấy khi cá chép tiếp xúc với quinalphos trực tiếp trong hệ thống thí nghiệm, ngưỡng oxy của cá tăng theo nồng độ thuốc, dao động từ 0,13-0,45 mg/L và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ( $p < 0,05$ ). Đối với trường hợp bố trí gây nhiễm 24 giờ, ngưỡng oxy của cá cũng tăng theo sự gia tăng

nồng độ, dao động 0,13-0,65 mg/L và sự biến động này khác biệt có nghĩa so với đối chứng ( $p < 0,05$ ). So sánh ngưỡng oxy của cá trong điều kiện bố trí thuốc trực tiếp và gây nhiễm, ngưỡng oxy của cá trong điều kiện gây nhiễm cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với khi tiếp xúc thuốc trực tiếp ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 4: Ngưỡng oxy của cá chép khi tiếp xúc với quinalphos**

Nồng độ thuốc (mg/L)	Ngưỡng oxy (mg/L)	
	Bố trí gây nhiễm	Bố trí trực tiếp
0	0,13±0,04 <sup>aA</sup>	0,13±0,04 <sup>aA</sup>
0,076	0,52±0,04 <sup>bA</sup>	0,32±0,13 <sup>bB</sup>
0,152	0,57±0,03 <sup>bcA</sup>	0,37±0,07 <sup>bcB</sup>
0,38	0,61±0,07 <sup>cdA</sup>	0,41±0,06 <sup>bcB</sup>
0,57	0,65±0,09 <sup>dA</sup>	0,45±0,04 <sup>cB</sup>

*Các giá trị trình bày số trung bình±độ lệch chuẩn*

*Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a,b,c,d) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )*

*Các giá trị trong cùng một hàng cùng mẫu tự (A,B) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )*

#### 4 THẢO LUẬN

Sau 96 giờ thí nghiệm, giá trị pH giữa các nghiệm thức là rất ổn định. pH thích hợp đối với sự phát triển bình thường của cá chép là 6,5-9 (www.fao.org). Cá chép bột sẽ không tồn tại trong môi trường có pH thấp ( $pH < 4,5$ ). Tuy nhiên, khả năng chịu đựng pH của cá chép sẽ tăng dần theo giai đoạn phát triển của cơ thể và ổn định từ sau giai đoạn cá giống (Nguyễn Văn Kiểm, 2004). Trong nghiên cứu hiện tại, hệ thống thí nghiệm được bố trí trong mái che nên nhiệt độ khá ổn định, chênh lệch nhiệt độ buổi sáng và buổi chiều tối đa khoảng 1,5°C. Nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của cá chép là 23-30°C (www.fao.org). Hàm lượng oxy trong bể luôn được duy trì > 5 mg/L do các bể được sục khí nhẹ. Nguyễn Văn Kiểm (2004) cho rằng phôi cá chép sẽ chết nếu hàm lượng oxy hòa tan trong nước thấp hơn 1 mg/L. Ngưỡng oxy cá chép bột thường cao hơn ngưỡng oxy cá chép thịt 1,5-2 lần. Theo Kutty và Saunders (1972) cho rằng cá chép bơi lội bình thường khi hàm lượng oxy 1-2 mg/L (Trích dẫn www.fao.org). Tốc độ tăng trưởng của cá chép đạt 100% khi hàm lượng oxy là > 5 mg/l (www.fao.org). Hàm lượng oxy ở các bể thí nghiệm là rất phù hợp cho cá chép phát triển, không ảnh hưởng hoạt tính men ChE.

Nghiên cứu hiện tại cho thấy hoạt tính ChE ở não sau 96 giờ bị ức chế có ý nghĩa ở các nồng độ thuốc ngay cả ở nồng độ rất thấp (0,0076 mg/L) là 23,5%, mức độ ức chế ChE ở nồng độ 0,076; 0,152; 0,38 và 0,57 mg/L là rất cao, dao động 78-92%.

Kết quả thí nghiệm phù hợp với các nghiên cứu của Đỗ Văn Bước (2010), cho thấy mức độ ức chế ChE ở não cá rô phi khi tiếp xúc với quinalphos ở nồng độ 0,84% dao động 82,2-90,9% sau 96 giờ. Trong khi đó, mức độ ức chế ChE ở não cá chép đối với cá sắp chết khi tiếp xúc với thuốc trừ sâu hoạt chất carbamate là trên 82% Nguyễn Trọng Hồng Phúc, 2009).

Theo Zinkl *et al.* (1991), hoạt tính AChE bị ức chế trên 70% có nguy cơ dẫn đến tử vong. Tuy nhiên có những nghiên cứu khác cho thấy cá có khả năng chịu đựng được mức ức chế ChE trên 90% (Day và Scott, 1990; Balint *et al.*, 1995; Pan and Dutta, 1998).



Dutta và Arends (2003), khi hoạt tính men ChE bị ức chế, acetylcholine không bị suy giảm mà nó tích lũy ở các khớp thần kinh, tuy nhiên làm biến đổi toàn bộ chức năng bình thường của hệ thần kinh (Trích dẫn bởi Modesto *et al.*, 2010) và có thể ảnh hưởng đến vận động và trạng thái thăng bằng của sinh vật khi tiếp xúc với độc chất (Bretaud *et al.*, 2000; trích dẫn bởi Modesto *et al.*, 2010).

Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính ChE bị ức chế có ý nghĩa ở các nồng độ thuốc trong 96 giờ thí nghiệm. Tổng hợp một số nghiên cứu cho thấy hoạt tính ChE bị ức chế đáng kể trong 96 giờ. Theo Cong *et al.* (2006), hoạt tính ChE bị ức chế ý nghĩa sau 6 giờ ở nồng độ 0,52 mg/L và 12 giờ ở nồng độ 0,079 mg/L khi cá lóc (*Channa striata*) tiếp xúc với diazinon (Basudin 50EC). Nồng độ diazinon càng cao, hoạt tính ChE càng giảm có ý nghĩa sau 96 giờ. Cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*) khi tiếp xúc với nồng độ LC<sub>50</sub> và nồng độ dưới ngưỡng gây chết thì hoạt tính ChE ở não và mang bị ức chế 90% trong 24 giờ và phục hồi hoàn toàn sau 28 ngày (Venkateswara *et al.*, 2003; trích dẫn Guimaraes *et al.*, 2007). Nguyễn Trọng Hồng Phúc (2009) cho rằng khi cá chép (*Cyprinus carpio*) giống tiếp xúc với hoạt chất fenobucarb (gốc carbamate), hoạt tính ChE ở não bị ức chế ở ngày thứ 4, ở nồng độ 10,3 mg/L, mức độ ức chế là 89,3%.

Balint *et al.* (1995) cho rằng khi xử lý 2 mg/L mediathion đối với cá chép (*Cyprinus carpio*) trong 5 ngày, hoạt tính AChE ở não giảm 90–92%.

Trong nghiên cứu hiện tại, hoạt tính ChE ở não cá chép rất nhạy cảm với thuốc trừ sâu quinalphos dù ở nồng độ rất thấp (0,0076 mg/L). Độ nhạy cảm AChE khác nhau tùy loài, não và cơ là những cơ quan được nghiên cứu nhiều nhất (Sancho *et al.*, 2000; trích dẫn Modesto *et al.*, 2010).

Theo kết quả điều tra về tình hình sử dụng thuốc trừ sâu trong mô hình lúa cá ở thành phố Cần Thơ (chưa công bố) cho thấy nông dân ở địa bàn xã Thới Hưng, huyện Cờ Đỏ (Nông trường Sông Hậu) áp dụng mô hình cá lúa kết hợp chiếm tỷ lệ 78% (14/18 hộ điều tra) trong đó có khoảng 70% số hộ phun thuốc trừ sâu trực tiếp vào ruộng đang nuôi cá mà không áp dụng các biện pháp kỹ thuật như hạ mức nước cho cá xuống mương bao, sau khoảng một tuần mới dâng nước lên ruộng. Ngoài ra, nông dân ở Nông trường sông Hậu đã sử dụng thuốc trừ sâu quinalphos khi ruộng đang nuôi cá chiếm tỷ lệ 17% (3/18 số hộ sử dụng), kết quả được ghi nhận cho thấy một số cá chết khi phun thuốc quinalphos khi mức nước trên ruộng thấp (<10 cm); một nông dân khác cho biết, dâng mức nước trên ruộng > 20 cm khi phun thuốc quinalphos thì cá nuôi không bị ảnh hưởng nhiều. Chính vì vậy, việc phun thuốc trừ sâu vào ruộng lúa không đúng cách và sử dụng thuốc trừ sâu quinalphos có độc tính cao (Nguyễn Quang Trung và Đỗ Thị Thanh Hương, 2012) trong mô hình lúa-cá kết hợp có thể ảnh hưởng đến sức khỏe cá nuôi trong ruộng do sự ức chế mạnh hoạt tính men cholinesterase lên cá chép.

Sự tích lũy của acetylcholine do sự giảm hoạt tính men có thể ảnh hưởng đến tập tính sinh sản và lẫn trốn của cá, ảnh hưởng trực tiếp đến sự sống của loài (Saglio and Trijasse, 1998; Bretaud *et al.*, 2000; trích dẫn Modesto *et al.*, 2010).

Đo lường hoạt tính AChE ở cá được áp dụng nhằm kiểm tra độ độc thần kinh khi tiếp xúc với thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ. Thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ ức chế AChE phụ thuộc vào nồng độ thuốc và thời gian, mức độ ức chế khác nhau phụ

thuộc vào loài và tuổi (Ansari *et al.*, 1987; Keizer *et al.*, 1995; Szegetes *et al.*, 1995; trích dẫn Ozcan Oruc, 2007).

Kết quả thí nghiệm cho thấy hoạt tính ChE chưa có biểu hiện phục hồi hoàn toàn sau 96 giờ. Trong công thức cấu tạo của quinalphos (gốc lân hữu cơ) có liên kết P=S bền hơn liên kết P=O do đó có thể ảnh hưởng đến sự phục hồi hoạt tính ChE khi tiếp xúc với hoạt chất quinalphos. Sự phục hồi chậm của AChE khi tiếp xúc với thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ là do quá trình phosphoryl hóa acetylcholinesterase dẫn đến sự tích tụ acetylcholine, trong khi đó những tác động tương tự không xảy ra ở thuốc trừ sâu gốc carbamate (Bradbury *et al.* 2008; trích dẫn Loi, 2010).

Sự ức chế hoạt tính ChE được sử dụng rộng rãi như là đánh dấu sinh học đối với thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ và carbamate (Edward *et al.*, 1991).

Trong nghiên cứu hiện tại, khi cá mới bị nhiễm thuốc, chất độc sẽ hấp thu vào cơ thể chủ yếu qua mang, do đó cá phải tăng cường trao đổi chất và hô hấp qua mang để duy trì sự sống dẫn đến tiêu hao oxy của cá tăng trong thời gian đầu tiếp xúc với thuốc. Trong điều kiện gây nhiễm 24 giờ trước khi bố trí, mặc dù cá được chuyển sang môi trường nước sạch hoàn toàn, hoạt tính ChE ở não bị ức chế đáng kể trong 24 giờ và mức độ ức chế tăng theo nồng độ thuốc nên ở nồng độ thuốc càng cao, hoạt động trao đổi chất và hô hấp qua mang càng yếu đi, kết quả là tiêu hao oxy có xu hướng giảm theo nồng độ.

Trong khi đó, ngưỡng oxy của cá có chiều hướng tăng ở cả hai trường hợp bố trí thuốc trực tiếp và gây nhiễm, tuy nhiên ngưỡng oxy của cá trong điều kiện gây nhiễm cao hơn so với khi cá tiếp xúc thuốc trực tiếp. Như đã đề cập ở trên, hoạt tính ChE bị giảm rất mạnh khi cá bị nhiễm thuốc trong 24 giờ từ đó ảnh hưởng đến hoạt động sinh lý bình thường của cơ thể, kết quả là khả năng chịu đựng điều kiện thiếu hụt oxy của cá trong điều kiện gây nhiễm thấp hơn so với cá mới tiếp xúc với thuốc. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu của Murty (1988) và Đỗ Thị Thanh Hương (1997). Các tác giả này cho rằng tiêu hao oxy của cá sẽ tăng trong thời gian đầu tiếp xúc với thuốc trừ sâu do hoạt động hô hấp gia tăng nhưng sau đó yếu dần và giảm.

Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cho thấy tiêu hao oxy ở cá có khuynh hướng giảm khi tiếp xúc với thuốc trừ sâu gốc lân hữu cơ như nghiên cứu của Shereena *et al.* (2009) cho rằng khi cá rô phi (*Tilapia mossambica*) tiếp xúc với thuốc trừ sâu dimethoate (gốc lân hữu cơ) sau 24 giờ cho thấy tiêu hao oxy của cá giảm theo nồng độ thuốc, dao động từ 282-522 mg O<sub>2</sub>/kg/giờ. Mathivanan (2004) cũng có cùng nhận định trên khi nghiên cứu cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*) tiếp xúc thuốc trừ sâu quinalphos.

Kết quả thí nghiệm cũng phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Thị Thanh Hương (1997), cho rằng ngưỡng oxy của cá mè vinh (cỡ 17,2 g) ở các mức nồng độ thuốc trừ sâu Basudin 40EC (hoạt chất diazinon thuộc gốc lân hữu cơ) tăng có ý nghĩa theo sự gia tăng nồng độ thuốc so với đối chứng, dao động 0,44-0,69 mg/L. Tác giả cũng cho biết ngưỡng oxy và tiêu hao oxy của cá sống trong môi trường có thuốc trừ sâu luôn cao hơn trong điều kiện không có thuốc và sự rối loạn hô hấp cũng là dấu hiệu đầu tiên của nhiễm độc thuốc trừ sâu.

## 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 5.1 Kết luận

- Hoạt tính của men ChE ở não cá chép rất nhạy cảm với thuốc trừ sâu quinalphos dù ở nồng độ rất thấp (0,0076 mg/L). Hoạt tính của men ChE ở não giảm đáng kể sau 96 giờ, dao động 23,5% ở nồng độ thấp nhất (0,0076 mg/L) đến 92% ở nồng độ cao nhất (0,57 mg/L). Hoạt tính ChE chưa có biểu hiện phục hồi hoàn toàn sau 96 giờ thí nghiệm.
- Khi cá tiếp xúc trực tiếp với quinalphos, tiêu hao oxy và ngưỡng oxy tăng cao so với đối chứng. Trong điều kiện gây nhiễm, ngưỡng oxy tăng theo sự gia tăng nồng độ thuốc, trong khi tiêu hao oxy giảm theo sự gia tăng nồng độ.

### 5.2 Đề xuất

Độc tính thuốc trừ sâu quinalphos đối với cá chép là khá cao nên khi sử dụng thuốc trừ sâu quinalphos trong mô hình lúa-cá kết hợp có thể ảnh hưởng đến sức khỏe cá nuôi trong ruộng, do đó nông dân nên hạn chế sử dụng thuốc trừ sâu quinalphos trên đồng ruộng. Ngoài ra, nông dân có thể chọn một loại thuốc ít độc đến cá mà có tác dụng tương tự như quinalphos.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balint, T., Szegletes, T., Szegletes, Zs., Halasy, K., Nemcsok, J., 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquat. Toxicol.* 33, 279–295.
- Berg H., 2001. Pesticide use in rice and rice - fish farm in the Mekong Delta, Viet Nam, *Crop Protection* 20: 897-905.
- Cong N.V., Phuong N.T., Bayley M. 2006. Sensitivity of brain cholinesterase activity to diazinon (BASUDIN 50 EC) and fenobucarb (BASSA 50 EC) insecticides in the air-breathing fish *Channa striata* (Bloch, 1973). *Environ Toxicol Chem* 25: 1418-1425
- Day, K.E., Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.* 18, 101–104.
- Đỗ Thị Thanh Hương, 1997. Ảnh hưởng của Basudin 50EC lên sự thay đổi chỉ tiêu sinh lý và huyết học của cá chép, cá rô phi, cá mè vinh. Luận án thạc sĩ ngành nuôi trồng thủy sản, trường Đại học Nha Trang.
- Đỗ Văn Bước, 2010. Ảnh hưởng của thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos (gốc lân hữu cơ) lên một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa và tăng trưởng của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*). Luận văn Thạc sĩ Nuôi trồng thủy sản--Đại học Cần Thơ
- Edwards, C.A., Fisher, S.W., 1991. The use of cholinesterase measurement in assessing the impact of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. In: Mineau, P. (Ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment*, Vol. 2. Chemicals in Agriculture. Elsevier, NewYork, NY, USA, pp. 255–275.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharma*, 7, pp. 88–95
- Guimaraes, A.T.B., H.C.S. Assis., W. Boeger., 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and hispathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68, pp: 57– 62.
- Heong K.L., M.M Escalada, N.H. Huan, V. Mai., 1998. Use of communication media in changing rice farmers' pest management in the Mekong Delta, Vietnam, *Crop Protection* 17: 413-425.

- Loi, H.P., 2010. Assessment of the effects of fenobucarb on Acetylcholinesterase activity and growth of Silver barb *Puntius gonionotus* (Bleeker, 1850). Master Thesis of *Asian Institute of Technology*.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193, pp. 265–275.
- Mathivanan, R. 2004. Effect of sublethal concentration of quinalphos on selected respiratory and biochemical parameters in the fresh water fish, *Oreochromis mossambicus*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.* 14 (1): 57-64.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup cause oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78; 294-299.
- Murphy, S.D., 1986. Pesticides. In: Doull, J., Klassen, C.D., Anders, M.O. (Eds.), *The Basic Science of Poisons*. MacMillan, New York. pp. 519–581.
- Murty, A.S., 1988. Toxicity of pesticides to fish Vol I, II. *Boca Raton, Florida*. 178 and 143 pp.
- Nguyễn Quang Trung và Đỗ Thị Thanh Hương, 2012. Ảnh hưởng của thuốc trừ sâu hoạt chất quinalphos đến hoạt tính men cholinesterase và glutathione-S-transferase của cá chép (*Cyprinus carpio*). *Tạp chí Khoa học-Đại học Cần Thơ* (2012), volume 22a, 131-142.
- Nguyễn Trọng Hồng Phúc, 2009. Ảnh hưởng của Fenobucarb lên các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính men cholinesterase (ChE) và tăng trưởng của cá Chép (*Cyprinus carpio*). Luận văn thạc sĩ – trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên – TPHCM. 96 trang.
- Nguyễn Văn Hào, Nguyễn Trọng Hiền, Phạm Đình Khôi, Nguyễn Thọ Đan và Don Griffiths, 2001. Những kết quả bước đầu về phát triển hệ thống canh tác lúa-cá ở Tiền Giang. *Kỷ yếu Hội thảo Quốc tế canh tác lúa cá*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 159 trang.
- Nguyễn Văn Kiêm, 2004. So sánh một số đặc trưng hình thái, sinh thái, sinh hóa và di truyền ba loại hình cá chép (chép vàng, chép trắng và chép Hung) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Luận án Tiến sĩ Nông Nghiệp*. 103 trang
- Oruc, E. O., D. Usta, 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 48–55
- Pan, G., H.M. Dutta., 1998. The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* by sublethal concentrations of diazinon. *Envir Res*, 79, 133-137.
- Phan Văn Thành, 2008. Đánh giá hiệu quả kinh tế và kỹ thuật của mô hình canh tác thủy sản-lúa trên ruộng ở thành phố Cần Thơ. *Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành nuôi trồng thủy sản*.
- Rao, J.V., 2004. Effects of monocrotophos and its analogs in acetylcholinesterase activity's inhibition and its pattern of recovery on euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 217–222.
- Rodrigues, E.L., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pacheco, F.J., Veiga, M.L., 2001. Histopathologic lesions in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentration of the organophosphate insecticide Dipterex 500s (Trichlorfon). *Acta Sci.* 23, 503–505.
- Shereena, K.M, S. Logaswamy, P. Sunitha, 2009. Effect of an organophosphorous pesticide (dimethoate) on oxygen consumption of the fish *Tilapia mossambica*. *Recent Research in Science and Technology* 2009, 1(1): 004–007
- Zinkl, J.G., Lockhard, W.L., Kenny, S.A. and Ward, F.J., 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In P. Mineau (eds). *Cholinesterase-inhibiting Insecticides*, pp. 233–254.
- Website: <http://www.fao.org>.