

PHỤC HỒI ENZYME CHOLINESTERASE TRONG THỊT CÁ RÔ (*ANABAS TESTUDINEUS*) SAU KHI TIẾP XÚC VỚI THUỐC SÂU DIAZINON

Ngô Tô Linh*, Nguyễn Văn Công†

1. Giới thiệu

Cá rô (*Anabas testudineus*) thường được tìm thấy ở nhiều dạng thủy vực nước ngọt như ao, hồ, kênh, rạch ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Ruộng lúa là nơi mà cá thường xuất hiện và có lẽ vì thế mà người dân Nam Bộ quen gọi là “cá rô đồng”. Đồng ruộng cũng là nơi mà thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) được sử dụng thường xuyên với lượng rất cao [1]. Những năm gần đây rầy nâu, bệnh vàng lùn và lùn xoắn lá xuất hiện và gia tăng ở ĐBSCL (www.ppd.gov.vn) nên hóa chất BVTV có thể được sử dụng nhiều hơn. Phần lớn thuốc BVTV được sử dụng là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường đất, nước ở ĐBSCL. Do vậy, cá rô không thể tránh khỏi những ảnh hưởng do sử dụng hóa chất BVTV trên đồng ruộng.

Thuốc BVTV Diazinon được sử dụng khá phổ biến trên ruộng lúa [5]. Hoạt chất này bền vững trong môi trường trung tính (Tomlin, 1994), môi trường thường gặp trên ruộng lúa. Nồng độ diazinon gây chết 50% cá rô cỡ giống sau 96 giờ (LC50-96h) là 6,55mg/L [8]. Diazinon thuộc nhóm lân hữu cơ, có liên kết P=S trong cấu tạo và gây chết động vật qua ức chế cholinesterase (ChE) [10], loại enzyme có chức năng chuyển tải các tín hiệu thần kinh ở động vật và rất nhạy cảm với hóa chất gốc lân hữu cơ và carbamate. Khi enzyme bị ức chế hơn 70% sẽ làm đa số sinh vật chết [4]. Công và cộng sự (2008) đã phát hiện sau 3 giờ tiếp xúc với Diazinon ở nồng độ 0,1 mg/L hoạt tính ChE ở não cá rô bị ức chế đến 59% và không có dấu hiệu phục hồi sau 48 giờ tiếp xúc. Trong canh tác lúa, thuốc BVTV được phun bình quân 20 ngày/lần [1]. Như vậy, khả năng phục hồi ChE trước lần phun tiếp theo như thế nào là vấn đề cần được tìm hiểu.

Nghiên cứu này được đặt ra nhằm tìm hiểu khả năng phục hồi ChE trong thịt cá rô sau khi tiếp xúc với diazinon. Kết quả nhận được sẽ là cơ sở cho dự báo rủi ro của việc phun thuốc BVTV Diazinon đến cá rô trong điều kiện thực tế.

* Khoa Môi trường & Tài nguyên Thiên Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

† TS. - Khoa Môi trường & Tài nguyên Thiên Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được triển khai tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Khoa học Môi trường, trường Đại học Cần Thơ.

2.2. Hóa chất

Thuốc BVTV Diazan 60EC chứa 60% trọng lượng diazinon [6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl] ester và 40% chất phụ gia do Công ty dịch vụ bảo vệ thực vật An Giang sản xuất được sử dụng để xem xét độc tính của diazinon lên cá rô đồng trong nghiên cứu này.

Hóa chất $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) và $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) dùng pha dung dịch đệm pH 7,4 và pH 8; 5,5 dithio-bis 2nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma Aldrich, Germany) và acetylcholine iodide (Sigma Aldrich, Germany) dùng để đo ChE; aceton (China) dùng để rửa cối nghiền trước khi nghiền mẫu tiếp theo.

2.3. Sinh vật thí nghiệm

Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) cỡ giống được mua từ trại cá giống ở thành phố Cần Thơ. Cá được thuần dưỡng trong bể composite 600L tại phòng thí nghiệm bộ môn Khoa học Môi trường 3 tuần. Hàng ngày cho cá ăn 2 lần (3-5% trọng lượng) bằng thức ăn viên và thay nước 1 lần. Cá khỏe mạnh và đồng cỡ được chọn để bố trí thí nghiệm. Trước khi bố trí thí nghiệm, ngưng cho cá ăn một ngày.

2.4. Phương pháp thí nghiệm

Bốn nồng độ diazinon 66, 94, 131 và 655 $\mu\text{g/L}$ (được pha từ dung dịch mẹ) và đối chứng (nước máy) (ĐC) được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại trong bể kiếng 50 lít. Mỗi lần lặp lại thả 30 cá rô ($3,95 \pm 0,73\text{g}$; $6,15 \pm 0,38\text{cm}$) khỏe mạnh. Cá được giữ trong bể chứa diazinon 2 ngày, sau đó cho ra bể composite 600L chứa sẵn 200 lít nước máy để theo dõi khả năng phục hồi ChE trong 28 ngày tiếp theo. Hệ thống thí nghiệm được sục khí liên tục. Mỗi ngày thay 30% nước và cho ăn một lần bằng thức ăn viên với lượng bằng khoảng 5% trọng lượng cá.

Hàng ngày đo oxy hoà tan (DO) và nhiệt độ bằng máy đo oxy (Thermo Orion, Germany) và pH (556 YSI). Mẫu cá được thu trước và 12, 24, 48 giờ sau khi xử lý. Trong giai đoạn phục hồi 2 ngày thu mẫu 1 lần trong tuần đầu. Sau đó 5 ngày thu 1 lần cho đến khi kết thúc 28 ngày thí nghiệm để đo ChE. Mỗi lần thu 5 cá cho mỗi nghiệm thức (mỗi lần lập lại thu 1 con).

2.5. Phân tích ChE

Sau khi thu, cá được giết bằng cách cho vào nước đá. Lấy mẫu thịt ở phía lưng bằng cân điện tử (Sartorius, Germany) có độ chính xác 0,001g rồi cho vào từng eppendorf đã đặt trên nước đá. Mô thịt của từng cá được nghiền riêng biệt trong dung dịch đệm 0,1M phosphate pH 7,4 bằng cối nghiền thủy tinh. Thể tích dung dịch đệm cho vào đảm bảo nồng độ thịt nghiền $\leq 30\text{mg/mL}$. Sau khi trộn đều bằng máy trộn (MS2, IKA, Wilmington, USA), lấy 1mL dung dịch cho vào eppendorf rồi ly tâm ở 4°C , tốc độ 2000 vòng/phút trong 20 phút bằng máy ly tâm (Sigma, Germany). Sau khi ly tâm, phần trong phía trên của từng mẫu được lấy ra để đo ChE bằng máy so màu quang phổ (U-2800, Hitachi, Japan) ở bước sóng 412nm [3]. Kết quả được ghi nhận khi hệ số tương quan (r^2) đạt từ 0,9 trở lên.

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được kiểm tra phân phối chuẩn và đồng nhất phương sai trước khi phân tích phương sai (one - way ANOVA). Kiểm định Dunnett test được áp dụng để so sánh sai khác với đối chứng. Phần mềm SPSS 10.0 được sử dụng để xử lý thống kê.

3. Kết quả và thảo luận

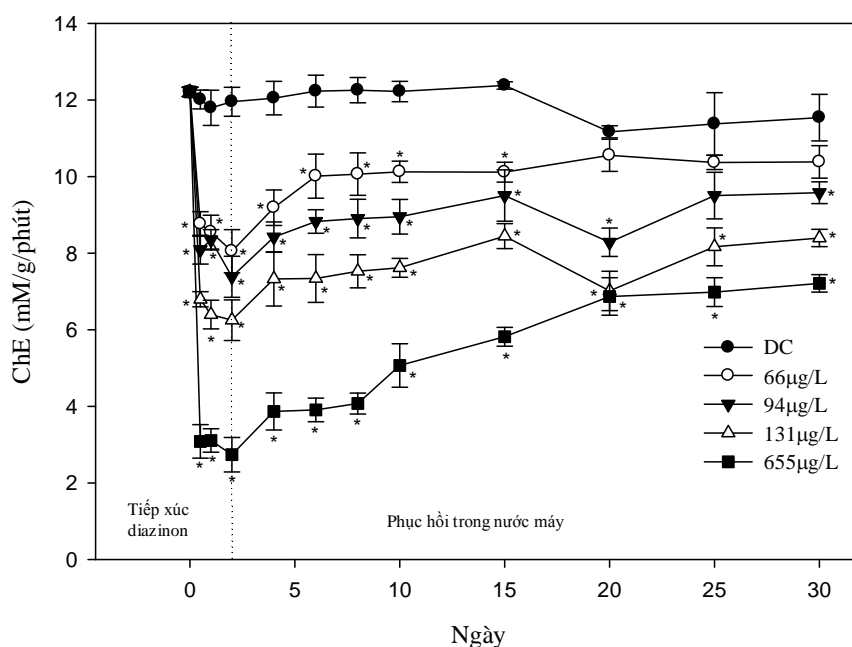
3.1. Kết quả

Trong suốt thời gian thí nghiệm, nhiệt độ trung bình các nghiệm thức dao động trong khoảng $27,8 \pm 0,72^{\circ}\text{C}$ (Trung bình \pm độ lệch chuẩn), pH $7,08 \pm 0,40$ và DO $6,95 \pm 0,54\text{ mg/L}$.

ChE ở nghiệm thức ĐC bình quân là $12\mu\text{M/g/phút}$. Sau 12 giờ tiếp xúc với diazinon, ChE ở nghiệm thức 66, 94, 131 và $655\mu\text{g/L}$ diazinon giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) lần lượt bằng 73, 67, 57, và 26% so với ĐC. Mức độ ức chế không tăng đáng kể khi thời gian tiếp xúc kéo dài đến 24 hay 48 giờ. Trước khi

cho ra nước sạch, hoạt tính ở nghiệm thức 66, 94, 131 và 655 $\mu\text{g/L}$ diazinon lần lượt bằng 67, 62, 52 và 23% so với ĐC (Hình 1).

Sau khi cho cá ra nước máy, thay nước và cho ăn thì ChE tăng dần theo thời gian ở tất cả các nghiệm thức. Ở nồng độ 66 và 94 $\mu\text{g/L}$ chỉ sau 2 ngày ChE đã ở mức $\geq 70\%$ ĐC. Ở nồng độ 131 $\mu\text{g/L}$ dù mức độ ức chế tối đa trong giai đoạn tiếp xúc với diazinon chỉ khoảng 50% nhưng đến 23 ngày sau khi cho ra nước sạch ChE mới phục hồi ở mức $\geq 70\%$ ĐC. Còn ở nồng độ 655 $\mu\text{g/L}$ sau 28 ngày trong nước sạch ChE chỉ đạt mức 60% so với ĐC.



Hình 1: Hoạt tính ChE ($TB \pm SD$, $n=5$) ở thịt cá rô trong thời gian tiếp xúc với Diazinon và sau khi cho ra nước sạch. Dấu * chỉ sai khác so với đối chứng ($p < 0,05$, Dunnett test) ở cùng thời gian thu mẫu.

3.2. Thảo luận

ChE bị ức chế bởi diazinon không chỉ phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc mà còn theo nồng độ tiếp xúc. Việc đánh giá mức độ nhạy cảm theo nồng độ và khả năng phục hồi của ChE có ý nghĩa quan trọng trong đánh giá khả năng sử dụng

ChE để chỉ mức độ nhiễm bản thuốc BVTV trong nước cũng như cung cấp bằng chứng cho thấy sinh vật đã từng sống trong môi trường nhiễm bản thuốc BVTV.

Kết quả chỉ ra rằng nồng độ diazinon càng cao thì ChE còn lại càng thấp; mức độ ức chế tăng theo thời gian tiếp xúc và đạt cao nhất trong khoảng 24 đến 48 giờ (Hình 1). Khi thời gian tiếp xúc tăng thì lượng diazinon xâm nhập vào cá rô tăng và làm tăng mức độ ức chế ChE. Kết quả tương tự cũng phát hiện ở cá lóc *Channa striata* [2]. Mặc khác, diazinon có liên kết P=S (Tomlin, 1994); liên kết này không gây ức chế ChE trực tiếp trừ phi nó được oxy hoá thành dạng P=O [0]. [6]. cho thấy sau khi oxy hoá diazinon dạng P=S thành P=O sẽ làm cho tỷ lệ ức chế ChE tăng từ 13 lên 73%. Do đó, trong thời gian đầu tiếp xúc với diazinon, dù hoá chất này đã thâm nhập vào cá rô nhưng sản phẩm P=O bị oxi hoá từ dạng nguyên thủy P=S có lẽ chưa nhiều nên ChE bị ức chế còn ít. Tuy nhiên, cần kiểm chứng khả năng oxi hoá từ P=S thành P=O để có thể khẳng định cụ hơn.

Dù trong giai đoạn tiếp xúc thuốc hay cho ra nước sạch ChE ở tất cả các nồng độ đều thấp hơn đối chứng ($p < 0,05$). Đa số sinh vật chết khi ChE bị ức chế hơn 70% (Fulton and Key, 2001). Trong thí nghiệm này, ở nồng độ $66\mu\text{g/L}$ hoạt tính ChE bị ức chế $< 30\%$ (Hình 1) nên có lẽ sẽ không làm ảnh hưởng đến sự sống còn của cá rô. Tuy nhiên, ở nồng độ này đã thấy rõ ảnh hưởng của diazinon lên ChE ($p < 0,05$). Do đó sử dụng ChE ở cá rô để đánh dấu sinh học cho thấy cá đã tiếp xúc với môi trường nhiễm bản diazinon là rất tốt.

Trong nghiên cứu này, dù ChE ở cá rô có phục hồi sau khi cho ra nước sạch nhưng vẫn sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Sau 2 ngày cho ra nước sạch, ChE đã phục hồi $\geq 70\%$ ở nồng độ 66 và $94\mu\text{g/L}$. Ở nồng độ 131 và $655\mu\text{g/L}$, nồng độ đã từng được phát hiện trên ruộng sau khi phun [3]. ChE phục hồi chậm hơn rất nhiều và khi kết thúc thí nghiệm chỉ phục hồi từ 60 - 65%. Diazinon gây ức chế lâu dài ChE đã được phát hiện ở cá lóc *C. striata* [2], sau 20 ngày ChE phục hồi khoảng 70% ở nồng độ lớn hơn $8\mu\text{g/L}$. Rao (2004) phát hiện sinh vật tiếp xúc với những loại thuốc BVTV lân hữu cơ có liên kết P=S thì sự phục hồi ChE sẽ chậm hơn thuốc có liên kết P=O; thời gian phục hồi hoàn toàn ChE trong não cá rô phi *Oreochromis mossambicus* mất 36 ngày sau khi tiếp xúc với thuốc có liên kết P=S (diazinon), trong khi đó chỉ mất 22 ngày đối với thuốc có liên kết P=O (monochlorophos). Ngoài ra, trong quá trình ức chế ChE, một nhóm alkyl của lân hữu cơ có thể biến mất, ChE không thể phục hồi như bình

thường; hiện tượng này được gọi là chemical aging và đã được phát hiện ở cá lóc sau khi tiếp xúc với phun diazinon trên ruộng lúa [3]. Trong nghiên cứu này, ChE ở thịt cá rô bị ức chế trong lâu dài có thể do chemical aging xảy ra.

Tóm lại, ở điều kiện phòng thí nghiệm, trong 24 đến 48 giờ tiếp xúc, ChE bị ức chế khoảng 80% ở nồng độ 655 μ g/L và chỉ phục hồi khoảng 60% khi kết thúc 30 ngày thí nghiệm. Ở điều kiện ngoài đồng, đa số người dân phun thuốc ở liều lượng cao và phun nhiều lần trong một vụ [1]. Cá rô có thể sẽ tiếp xúc với lần phun tiếp theo trong khi ChE chưa phục hồi hoàn toàn. Vì thế hoạt tính ChE của cá sống trên ruộng có thể sẽ thường xuyên thấp hơn mức bình thường. Mức độ ức chế hoạt tính enzyme khi phun thuốc diazinon ngoài thực tế có lẽ sẽ nhiều hơn và thời gian phục hồi sẽ chậm hơn so với điều kiện bố trí trong phòng thí nghiệm. Vấn đề này được nghiên cứu cụ thể trong thí nghiệm trên đồng ruộng.

4. Kết luận

Hoạt tính ChE trong thịt cá rô rất nhạy cảm với diazinon, sau 12 giờ tiếp xúc ở nồng độ 66 μ g/L ChE đã giảm 27% và sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$); mức độ ức chế tăng theo sự gia tăng của nồng độ.

Tốc độ phục hồi ChE nhanh trong tuần đầu sau khi cho ra nước sạch nhưng hoạt tính ChE vẫn còn thấp và sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng sau 4 tuần phục hồi.

Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của hóa chất này lên cá ở điều kiện đồng ruộng.

Sử dụng ChE ở cá rô để quan trắc môi trường nhiễm bẩn do phun diazinon và ảnh hưởng của nó đến sinh vật.

Hạn chế sử dụng diazinon trên ruộng vì nó gây ảnh hưởng lâu dài và nghiêm trọng đến hoạt tính ChE ở cá rô đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Berg H. (2001), *Pesticide use in rice and rice-fish farm in the Mekong Delta, Viet Nam*, *Crop Protection* 20, 897 - 905.

- [2]. Cong N.V., Phuong N.T., 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), 112 -119.
- [3]. Cong N.V., Phuong N.T., Bayley M., (2008), *Brain cholinesterase response in the snakehead fish (Channa striata) after field exposure to diazinon*, Ecotoxicol, Environ. Saf. 71, 314-318.
- [4]. Fulton M.H., Key P.B., (2001), *Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of Organophosphorus insecticide exposure and effects*, Environmental Toxicology and Chemistry 20(1), 37 - 45.
- [5]. Huan N.H., Mai V., Escalada M.M., Heong K.L., (1999), *Changes in rice farmers' pest management in the Mekong Delta, Vietnam*, Crop Protection 18, 557 - 563.
- [6]. Lee H.S., Kim Y.A., Lee Y.T., (2002), *Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor*, Chemosphere 46, 571 - 576.
- [7]. Nguyễn Văn Công, Nguyễn Tuấn Vũ, Trần Sỹ Nam (2008), *Nhạy cảm của cholinesterase ở cá rô đồng (Anabas testudineus) giống với diazinon và fenobucarb*, Tạp chí khoa học ĐHSP TP. HCM 14, 69-78.
- [8]. Rahman M.Z., Hossain Z., Mollah M.F.A., Ahmed G.U. (2002), *Effects of Diazinon 60EC on Anabas testudineus, Channa punctatus and Barbodes gonionotus*, Naga, The ICLARM Quarterly 25 (2), 8-12.
- [9]. 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*, Exotoxicol Environ Saf 59, 217 - 222.
- [10]. Tomlin C. (ed) (1994), *The pesticide manual: Incorporating the Agrochemicals Handbook, 10th*, British Crop Protection Publication, pp 296 - 297.

Tóm tắt

**Phục hồi enzyme cholinesterase trong thịt cá rô (*Anabas testudineus*)
sau khi tiếp xúc với thuốc sâu diazinon**

Sau khi cho cá rô (*Anabas testudineus*) tiếp xúc với diazinon ở các nồng độ 66, 94, 131, 655 μ g/L trong 2 ngày rồi cho ra nước sạch để theo dõi phục hồi enzyme cholinesterase activity (ChE). Kết quả cho thấy tốc độ phục hồi ChE nhanh trong tuần đầu sau khi cho ra nước sạch nhưng sau bốn tuần hoạt tính ChE vẫn còn thấp hơn đối chứng ($p < 0,05$), ngoại trừ ở nồng độ thấp nhất hoạt tính không còn sai khác so với đối chứng sau 2 tuần phục hồi. Kết quả chỉ ra rằng hoạt tính ChE ở cá rô sống trên ruộng lúa có khả năng thường xuyên bị ức chế. Qua đó cho thấy cần hạn chế sử dụng diazinon trên ruộng.

Từ khóa: *Anabas testudineus*, diazinon, cholinesterase, phục hồi

Abstract

**Recovery of muscle cholinesterase in climbing perch (*Anabas testudineus*)
after exposed to insecticide diazinon**

Expose climbing perch to 0.66, 0.94, 131 and 655 μ g/L of diazinon for 48 hours and then moved into clean water for ChE recovery monitoring for 28 days. Results showed that ChE recovered quickly in the first week but the activity in most treatments, excluding the lowest concentration were still significant lower than control ($p < 0.05$). These findings infer that ChE activity of climbing perch would be often in case of inhibition when living on rice field of the Mekong delta and this recovery should be investigated in the field condition.

Keywords: *Anabas testudineus*, diazinon, cholinesterase, recovery