Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
website: sj.ctu.edu.vn

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.129

ẢNH HƯỞNG CỦA NITRITE LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU SINH LÝ VÀ TĂNG TRƯỞNG CỦA CÁ BA SA *(Pangasius bocourti)*

Nguyễn Thị Kim Hà[1], Nguyễn Trần Phương Thảo[1], Trần Thị Phương Hằng[1], Nguyễn Thanh Phương[1], Mark Bayley[2] và Đỗ Thị Thanh Hương[1]

[1]*Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ*
[2]*Bộ môn Khoa học sinh học, Trường Đại học Aarhus, Đan Mạch*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 10/03/2017
Ngày nhận bài sửa: 04/08/2017
Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

Title:
Ảnh hưởng của nitrite lên một số chỉ tiêu sinh lý và tăng trưởng của cá ba sa (Pangasius bocourti)

Từ khóa:
Nitrite, Pangasius bocourti, sinh lý, tăng trưởng, tỷ lệ sống

Keywords:
Growth, nitrite, Pangasius bocourti, physiological, survival rate

ABSTRACT

This study was carried out to determine the effects of nitrite on some physiological parameters and growth performance of ba sa catfish (Pangasius bocourti). The study was triplicated and consisted of 4 treatments with diffenrent nitrite level (Control – 0mM, 0.09 mM, 0.22 mM and 0.44 mM NO_2^-). The first experiment of the study was performed in two weeks and the blood samples were collected at 0 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours, 96 hours, 7 days and 14 days after exposure to nitrite to evaluate parameters such as number of red blood cells, hemoglobin concentration, hematocrit, metHb, glucose, $[Cl^-]$ and $[NO_2^-]$ in plasma. In growth performance experiment, ba sa catfish was reared for 60 days in nitrite exposed condition. The results showed that the number of red blood cells, hemoglobin concentration, hematocrit and $[Cl^-]$ were significantly decreased while metHb and $[NO_2^-]$ in plasma of fish were increased after exposure to nitrite of 0.22 mM and 0.44 mM NO_2^- treatments. Besides, weight gain, DWG and SGR were significantly decreased while FCR increased in the treatments of 0.22 mM and 0.44 mM NO_2^- after 60 days ($p<0.05$) compared with the control treatment. In general, the presence of nitrite in water might result in negative effects for ba sa catfish, and should be minimized in fish rearing systems.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của nitrite đến các chỉ tiêu sinh lý và tăng trưởng của cá ba sa. Nghiên cứu được thực hiện với 4 nồng độ nitrite: không bổ sung nitrite (đối chứng), 0,09 mM, 0,22 mm và 0,44 mM NO_2^- và 3 lần lặp lại. Trong thí nghiệm ảnh hưởng của nitrite lên các chỉ tiêu sinh lý của cá ba sa, máu cá được thu ở các thời điểm 0; 24; 48; 72; 96 giờ; 7 ngày và 14 ngày sau khi bổ sung nitrite để đánh giá các chỉ tiêu hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, metHb, glucose, $[Cl^-]$ và $[NO_2^-]$ trong huyết tương. Thí nghiệm ảnh hưởng của nitrite lên tăng trưởng của cá ba sa được thực hiện trong 60 ngày. Kết quả cho thấy nitrite ở nồng độ 0,22 mM và 0,44 mM làm giảm số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit và ion Cl^-, đồng thời làm tăng phần trăm metHb và nồng độ NO_2^- tích lũy trong huyết tương cá ba sa. Nitrite ở hai nồng độ này còn làm giảm tăng trọng, DWG, SGR và làm tăng FCR của cá so với nhóm đối chứng trong thời gian 60 ngày. Từ đó cho thấy sự hiện diện của nitrite gây ra các ảnh hưởng bất lợi đối với cá. Vì vậy, cần hạn chế sự tồn tại của nitrite trong quá trình ương cá ba sa.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Kim Hà, Nguyễn Trần Phương Thảo, Trần Thị Phương Hằng, Nguyễn Thanh Phương, Mark Bayley và Đỗ Thị Thanh Hương, 2017. Ảnh hưởng của nitrite lên một số chỉ tiêu sinh lý và tăng trưởng của cá ba sa (*Pangasius bocourti*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52b: 93-102.

1 GIỚI THIỆU

Nitrite là thành phần tự nhiên của chu trình nitơ trong hệ sinh thái. Nitrite tồn tại trong ao nuôi thủy sản là vấn đề đáng lo ngại do nitrite gây độc với tất cả các động vật (Lewis and Morris, 1986). Trong ao nuôi thủy sản, các quá trình phân hủy xác động thực vật, thức ăn thừa hoặc chất thải của sinh vật sản sinh ra các hợp chất anmonia, các hợp chất này được một số loại vi khuẩn như nitrosomonas, nitrosopira hoặc các vi khuẩn khác chuyển hóa thành nitrite (Francis-Floyd *et al.*, 2015). Sự gia tăng mật độ nuôi cũng làm tăng lượng thức ăn sử dụng dẫn đến gia tăng các sản phẩm thải trong ao nuôi, từ đó làm tăng sự tích lũy các hợp chất nitơ trong môi trường (Hargreaves, 1998). Nitrite khi xâm nhập vào máu cá có thể oxy hóa hemoglobin (Hb) trong tế bào hồng cầu và chuyển thành một hợp chất khác là methemoglobin (metHb) gây ra bệnh máu nâu ở cá, metHb không có khả năng vận chuyển oxy, kết quả là cá có thể bị ngạt mặc dù nồng độ oxy trong nước không thấp (Kroupova *et al*., 2005). Động vật thủy sản sống trong môi trường nước nên có nguy cơ bị ngộ độc nitrite cao hơn các động vật khác vì nitrite có thể được hấp thu qua các biểu mô của mang và tích lũy với nồng độ cao trong cơ thể (Jensen, 2003). Ngoài ra, nitrite còn gây ảnh hưởng đến sinh lý, hô hấp, sự điều hòa ion, nội tiết… và tốc độ tăng trưởng của cá (Kosaka and Tyuma, 1987; Siikavuopio and Saether, 2006; Jensen, 2009; Lefevre *et al*., 2011).

Trước đây cá ba sa *(Pangasius bocourti)* là đối tượng được nuôi nhiều ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long do cá có thịt trắng và lớn nhanh nên có giá trị thương phẩm và xuất khẩu cao. Cá ba sa không có cơ quan hô hấp phụ nên khả năng chịu đựng với sự thay đổi các yếu tố môi trường kém (Phạm Văn Khánh, 2004), do đó khi môi trường biến động hoặc việc tích tụ các loại khí độc trong ao có thể gây bất lợi đối với loài cá này. Hiện nay, cá ba sa từ giai đoạn bột lên giống chủ yếu được ương trong ao với mật độ khá cao, vì vậy cá có khả năng bị ảnh hưởng bởi các loại chất độc trong ao. Các nghiên cứu trước đây về cá ba sa chỉ tập trung vào kỹ thuật nuôi, kỹ thuật sản xuất giống và nhu cầu dinh dưỡng như nghiên cứu của Cacot *et al.* (2002), Cacot *et al.* (2003) và Hung *et al.* (2004). Nghiên cứu về khả năng chịu đựng và thích nghi của cá ba sa đối với sự thay đổi các yếu tố môi trường vẫn chưa được thực hiện. Vì vậy, nghiên cứu "Ảnh hưởng của nitrite lên các chỉ tiêu huyết học và tăng trưởng của cá ba sa *(Pangasius bocourti)"* là rất cần thiết nhằm cung cấp thêm các thông tin về tác động của nitrite đến đối tượng này trong quá trình ương nuôi.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn cá ba sa thí nghiệm

Cá ba sa thí nghiệm có kích cỡ từ 15-20 g được mua từ cơ sở sản xuất giống ở Đồng Tháp. Sau khi vận chuyển về Khoa Thủy sản – Trường Đại học Cần Thơ, cá được thuần dưỡng trong các bể composite có thể tích 2 m^3 trong 2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Trong quá trình thuần dưỡng, cá được cho ăn 2 lần/ngày bằng thức ăn viên công nghiệp Cargill 30% đạm và ngưng cho cá ăn 1 ngày trước khi bố trí thí nghiệm. Cá thí nghiệm được lựa chọn từ những cá thể khỏe mạnh, không bị dị tật, không xây xát, kích cỡ đồng đều (trung bình 17,1±1,64 g) và không có dấu hiệu bệnh lý.

2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nitrite lên các chỉ tiêu sinh lý của cá ba sa

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nồng độ nitrite gồm: 10% LC_{50}-96 h (0,09 mM); 25% LC_{50}–96 h (0,22 mM); 50% LC_{50}–96 h (0,44 mM) và đối chứng (không bổ sung nitrite). Giá trị LC_{50}-96 h của nitrite đối với cá ba sa là 0,88 mM được xác định trong một thí nghiệm khác của Nguyễn Thị Kim Hà (số liệu chưa công bố). Cá được bố trí với mật độ 40 con/bể composite 500 L (300 L nước), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Sau khi cho cá vào bể ổn định 2 ngày, nitrite được bổ sung theo các nồng độ thí nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành trong 14 ngày. Trong thời gian thí nghiệm, bể được sục khí liên tục để đảm bảo oxy cho cá (oxy hòa tan từ 6,19±0,24 mg/L đến 6,73±0,13 mg/L). Cá được theo dõi và thu mẫu máu (3 con/bể) ở các thời điểm: 0; 24; 48; 72, 96 giờ, 7 ngày và 14 ngày sau khi bổ sung nitrite. Máu cá được thu ở động mạch đuôi bằng kim tiêm 1 mL có tráng Heparin. Trước khi lấy máu, cá được bắt nhẹ nhàng bằng vợt lưới và gây mê với benzocain nồng độ 0,1 g/L. Mẫu máu sau khi thu được chứa trong eppendorf 1,5 mL và giữ lạnh trong nước đá suốt quá trình thu, mẫu máu được sử dụng để phân tích các chỉ tiêu sinh lý máu như hồng cầu, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), methemoglobin (metHb); phần còn lại ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 6 phút thu huyết tương để phân tích các chỉ tiêu glucose, ion NO_2^- và ion Cl^- trong huyết tương. Cá không được cho ăn trong 96 giờ đầu, sau đó cho ăn mỗi ngày một lần. Các yếu tố môi trường như nhiệt độ, oxy, pH được kiểm tra 2 lần/ngày lúc 8 giờ và 15 giờ.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nitrite lên tăng trưởng của cá ba sa

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nồng độ nitrite như thí nghiệm 1, mỗi nghiệm

thức lặp lại 3 lần. Cá được bố trí với mật độ 40 con/bể 500 L (300 L nước). Thí nghiệm được tiến hành trong 60 ngày. Khối lượng cá được xác định tại các thời điểm: trước khi bố trí, sau khi bố trí 30 và 60 ngày để đánh giá các chỉ tiêu tăng trưởng. Cá được cho ăn 2 lần/ngày bằng thức ăn viên công nghiệp Cargill 30% đạm với 3% khối lượng thân. Hằng ngày, cá chết được theo dõi và đếm số cá còn lại khi kết thúc thí nghiệm để xác định tỷ lệ sống của cá. Chất thải ở đáy bể được loại mỗi ngày bằng cách xi phông và định kỳ thay nước 1 tuần/lần. Các yếu tố môi trường như nhiệt độ, oxy, pH cũng được kiểm tra mỗi ngày 2 lần (8 giờ và 15 giờ) bằng máy đo cầm tay hiệu Mettler toledo (Model SG2 và SG6); TAN được phân tích theo phương pháp Indophenol blue mỗi tuần 1 lần.

Nitrite sử dụng trong nghiên cứu này là dung dịch $NaNO_2$ 1M được pha từ muối $NaNO_2$ (Merck), nồng độ nitrite trong bể thí nghiệm được phân tích mỗi ngày hai lần bằng phương pháp Griess llosvay, Diazonium để kịp thời bổ sung và duy trì theo đúng nồng độ nitrite trong các nghiệm thức thí nghiệm.

Các chỉ tiêu tăng trưởng:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Số cá thể cuối}}{\text{Số cá thể ban đầu}} \text{ x } 100$$

Tăng trọng (g/con): WG = Wt-Wo

Tốc độ tăng trưởng theo ngày (g/ngày): $DWG = \frac{Wt-Wo}{t}$

Tốc độ tăng trưởng tương đối (%/ngày): $SGR = \frac{Ln(Wt) - Ln(Wo)}{t} \text{ x } 100$

$$\text{Hệ số chuyển hóa thức ăn: FCR} = \frac{\text{Lượng thức ăn sử dụng}}{\text{KL gia tăng + KL cá chết - KL cá ban đầu}}$$

Trong đó:

W_0: Khối lượng cá ở thời điểm ban đầu (g)
W_t: Khối lượng cá ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (g)
t: Thời gian nuôi (ngày)
Hệ số chuyển hoá thức ăn (FCR – Feed conversion ratio)

2.3 Phương pháp phân tích mẫu

Các chỉ tiêu sinh lý

Số lượng hồng cầu được phân tích bằng cách pha loãng mẫu máu 200 lần với dung dịch nhuộm Natt-Herick và dùng kính hiển vi để đếm mẫu ở độ phóng đại 40X. Hematocrit được xác định bằng cách cho mẫu máu vào tuýp hematocrit và ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 3 phút. Hemoglobin được xác định bằng thuốc thử Drabkin ở bước sóng 540 nm. MetHb được xác định bằng dung dịch phosphate buffer 0,02 M- pH 7,3 ở bước sóng 480-700 nm, phần trăm metHb được tính bằng phần mềm Sigma plot 12.5 (Lefevre *et al.,* 2011). Glucose phân tích theo phương pháp Hugget and Nixon (1957). [NO_2^-] trong huyết tương được đo bằng thuốc thử Griess reaction, hiệu chỉnh từ phương pháp của Miranda *et al*. (2001).

2.4 Phương pháp xử lí số liệu

Các số liệu được tính toán trung bình và độ lệch chuẩn bằng phần mềm Excel 2007. Sự khác biệt về các chỉ tiêu đánh giá giữa các nghiệm thức được so sánh bằng phân tích phương sai One-way ANOVA và kiểm định Duncan thông qua phần mềm SPSS 16.0, sai khác cho là có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của nitrite lên các chỉ tiêu sinh lý của cá ba sa

Hàm lượng nitrite được khống chế và duy trì theo đúng nồng độ các nghiệm thức trong thí nghiệm lần lượt 0,007±0,002, 0,083±0,013, 0,21±0,008 và 0,43±0,002 mM tương ứng với các nghiệm thức đối chứng, 0,09 mM, 0,22 mM và 0,44 mM.

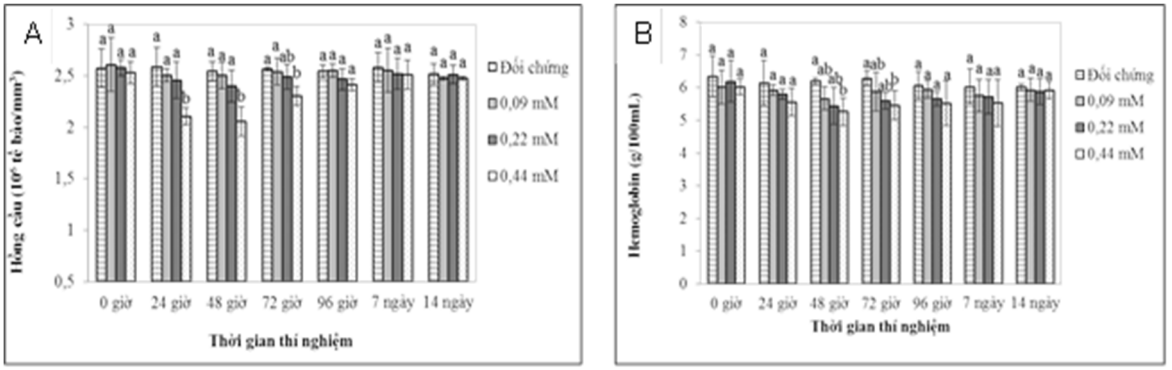
Trong quá trình thí nghiệm, các yếu tố môi trường như nhiệt độ, oxy, pH và TAN không có sự biến động lớn giữa các nghiệm thức. Nhiệt độ dao động từ 27,3±0,13°C đến 28,0±0,07°C; oxy hòa tan từ 6,19±0,24 mg/L đến 6,73±0,13 mg/L; pH từ 6,43±0,04 đến 6,82±0,13; TAN nằm trong khoảng 0,03±0,03 đến 0,10±0,01 mg/L. Nhìn chung, các thông số theo dõi nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của cá và không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm (Boyd, 1990).

3.1.1 Số lượng tế bào hồng cầu

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tất cả các nghiệm thức có bổ sung nitrite số lượng hồng cầu giảm thấp hơn nghiệm thức đối chứng ở tất cả các thời gian thu mẫu. Số lượng hồng cầu giảm từ sau 24 giờ đến 72 giờ tiếp xúc với nitrite. Hồng cầu giảm mạnh nhất là ở nghiệm thức 0,44 mM (giảm từ 2,53 xuống 2,11.10^6 TB/mm^3), thấp hơn có ý nghĩa (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng (2,59.10^6 TB/mm^3 ở thời điểm 24 giờ. Sau 96 giờ đến 14 ngày, số lượng hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung nitrite đã tăng trở lại và khác biệt không có ý nghĩa (p<0,05) so với đối chứng (Hình 1A).

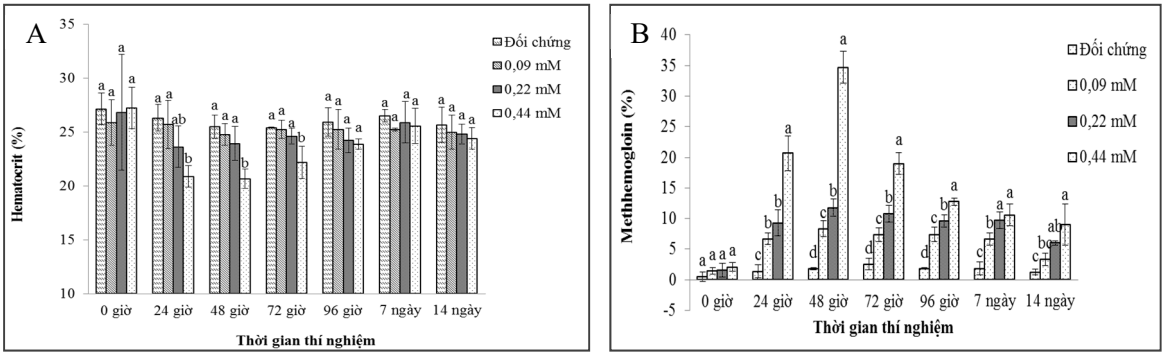
3.1.2 Hàm lượng hemoglobin

Sau 24 giờ thí nghiệm, hàm lượng Hb của cá ở tất cả các nghiệm thức có nitrite đều giảm thấp hơn so với đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa (p>0,05). Đến 48 giờ tiếp xúc, hàm lượng Hb của máu cá giảm xuống thấp nhất ở nghiệm thức 0,44 mM và 0,22 mM, tương ứng 5,27±0,42 và 5,44±0,56 g/100mL khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 0,44 mM. Hb tăng trở lại sau 96 giờ đến 14 ngày thí nghiệm ở các nghiệm thức có bổ sung nitrite và khác biệt không có ý nghĩa (p>0,05) so với đối chứng (Hình 1B).



Hình 1: Ảnh hưởng của nitrite lên số lượng hồng cầu (A) và hemoglobin (B) của cá ba sa

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) giữa các nghiệm thức trong cùng thời điểm thu mẫu)



Hình 2: Ảnh hưởng của nitrite lên chỉ số Hct (A) và metHb (B) của cá ba sa

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) giữa các nghiệm thức trong cùng thời điểm thu mẫu)

3.1.3 Chỉ số hematocrit

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỉ lệ Hct của cá ba sa giảm dần khi nồng độ nitrite tăng dần và giảm thấp sau 24 đến 72 giờ tiếp xúc nitrite (Hình 2A. Ở thời điểm từ 24 giờ đến 72 giờ tiếp xúc, chỉ số Hct giảm thấp có ý nghĩa (p<0,05) so với đối chứng ở nghiệm thức nitrite cao nhất 0,44 mM. Trong đó, chỉ số Hct giảm thấp nhất tại thời điểm 48 giờ, từ 27,2% (lần thu mẫu 0 giờ) xuống 20,9% ở nồng độ 0,44 mM. Hai nồng độ 0,09 mM và 0,22 mM cũng có xu hướng giảm qua thời gian thu mẫu nhưng giảm khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng. Hct tăng dần trở lại và không còn khác biệt so với nghiệm thức đối chứng từ thời điểm 96 giờ đến 14 ngày (p>0,05).

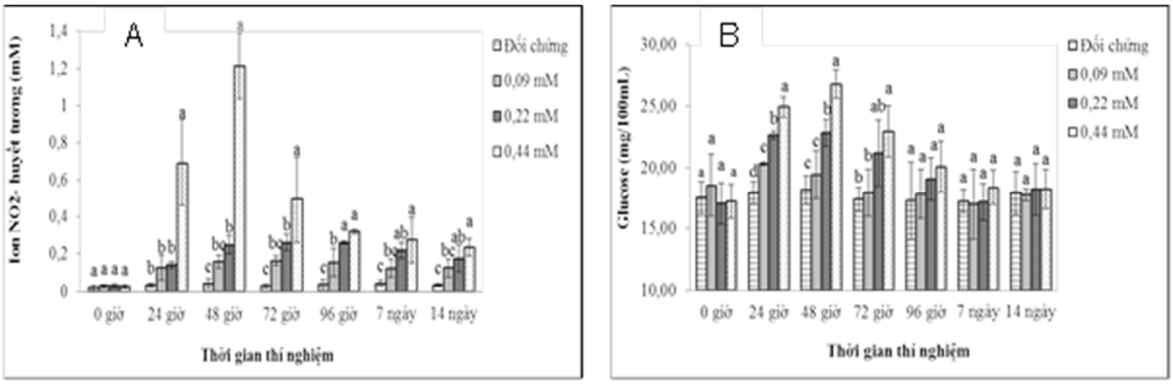
3.1.4 Hàm lượng metHb

Ngược lại với số lượng hồng cầu, Hb và chỉ số Hct, hàm lượng metHb trong máu của cá ba sa tăng nhanh sau 24 giờ tiếp xúc với nitrite và thể hiện rõ nhất ở nghiệm thức 0,22 mM và 0,44 mM. Sau 48 giờ, metHb trong máu cá ba sa tăng cao nhất đạt

giá trị 8,30%, 11,8% và 34,7% tương ứng với nghiệm thức 0,09 mM, 0,22 mM và 0,44 mM và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (p<0,05). Sau 72 giờ đến 96 giờ tiếp xúc, metHb ở tất cả các nghiệm thức có nitrite đã bắt đầu giảm theo thời gian thu mẫu nhưng vẫn cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng. Đến ngày thứ 14, hai nghiệm thức có nồng độ nitrite cao (0,22 mM và 0,44 mM) metHb đã giảm thấp nhưng vẫn khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (Hình 2B).

3.1.5 Nồng độ ion NO_2^- trong huyết tương

Nồng độ ion NO_2^- ($[NO_2^-]$) của cá ba sa biến động tương tự như metHb trong máu cá và được thể hiện ở Hình 3A. $[NO_2^-]$ ở các nghiệm thức có nitrite bắt đầu tăng sau 24 giờ tiếp xúc với nitrite (tăng từ 0,02 mM ở nghiệm thức đối chứng lên 0,69 mM ở nghiệm thức 0,44 mM). $[NO_2^-]$ tăng cao nhất sau 48 giờ tiếp xúc với nitrite ở nghiệm thức 0,44 mM NO_2^- đạt giá trị 1,21 mM, giá trị này cao hơn gần 3 lần so với nồng độ nitrite trong môi trường. Từ thời điểm 72 giờ đến 14 ngày, $[NO_2^-]$ có xu hướng giảm theo thời gian thu mẫu, tuy nhiên nghiệm thức 0,22 mM và 0,44 mM $[NO_2^-]$ vẫn còn cao hơn (lần lượt là 0,18 mM và 0,23 mM) và khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) so với đối chứng (0,03 mM).



Hình 3: Ảnh hưởng của nitrite lên ion $[NO_2^-]$ (A) và glucose (B) của cá ba sa

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) giữa các nghiệm thức trong cùng thời điểm thu mẫu)

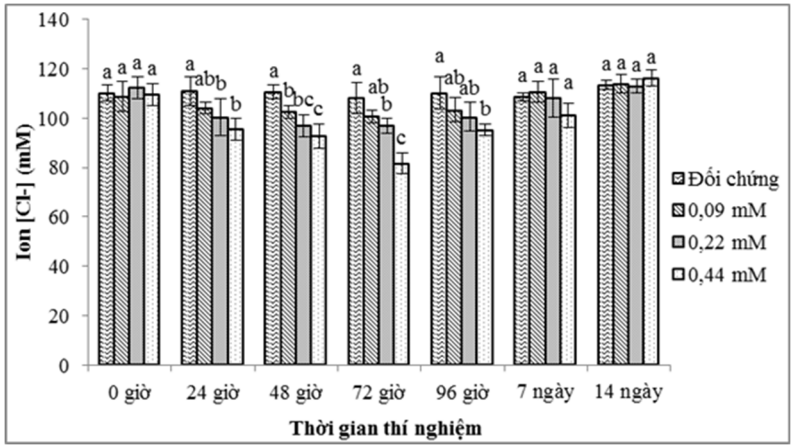
3.1.6 Nồng độ glucose trong huyết tương

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng glucose trong máu của cá ba sa biến động đáng kể khi cá tiếp xúc nitrite. Sau 24 giờ, glucose tăng dần theo sự tăng của nồng độ nitrite và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (p<0,05) (Hình 3B). Hàm lượng glucose tăng cao nhất sau 48 giờ, nghiệm thức 0,44 mM tăng từ 17,2 mg/100 ml (ở thời điểm 0h) lên 26,8 mg/100 ml; nghiệm thức 0,22 mM tăng từ 17,1 mg/100 ml lên 22,9 mg/100 ml; khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng (p<0,05). Từ thời điểm 96 giờ đến khi kết thúc thí nghiệm hàm lượng glucose liên tục giảm và khác biệt không có ý nghĩa ở tất cả các nghiệm thức (p>0,05).

3.1.7 Ion Cl^- trong huyết tương

Ở các nghiệm thức tiếp xúc với nitrite, nồng độ ion Cl^- ($[Cl^-]$) giảm sau 24 giờ đến 72 giờ tiếp xúc với nitrite. Sau 72 giờ tiếp xúc, $[Cl^-]$ giảm mạnh nhất ở nghiệm thức 0,22 mM và 0,44 mM (lần lượt là 97 mM và 82 mM). Đến lần thu mẫu 96 giờ, $[Cl^-]$ tăng dần trở lại, tuy nhiên ở nồng độ 0,44 mM vẫn còn thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng (p<0,05). Đến thời điểm 7 ngày và 14 ngày $[Cl^-]$, tất cả các nghiệm thức đã tăng trở lại và không còn khác biệt so với đối chứng (Hình 4).

Các kết quả thí nghiệm về ảnh hưởng của nitrite lên chỉ tiêu sinh lý cá ba sa cho thấy, số lượng tế bào hồng cầu, hàm lượng Hb và chỉ số Hct trong máu cá ba sa ở các nghiệm thức bổ sung nitrite giảm thấp hơn nghiệm thức đối chứng (p<0,05). Kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu đã được công bố trên cá tra (Lefevre *et al.,* 2011), cá thát lát (Nguyễn Thị Thụy Vũ, 2015) và cá lóc (Đỗ Thị Thanh Hương và Lê Trần Tường Vi, 2013) là các chỉ tiêu này giảm khi cá tiếp xúc với nitrite



Hình 4: Ảnh hưởng của nitrite lên ion [Cl^-] của cá ba sa

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$) giữa các nghiệm thức trong cùng thời điểm thu mẫu)

Sự giảm nồng độ Hb trong máu cá là do sự oxy hóa Fe^{2+} trong Hb thành Fe^{3+} bởi nitrite, điều này làm cho Hb trong tế bào hồng cầu bị chuyển thành metHb và làm giảm khả năng vận chuyển oxy của cá (Kosaka and Tyuma, 1987; Jensen, 2009). Kết quả nghiên cứu này cho thấy, đồng thời với sự giảm Hb trong máu là sự gia tăng cao phần trăm metHb khi cá tiếp xúc với nitrite ở nồng độ 0,22 mM và 0,44 mM NO_2^-. Nghiên cứu của Lefevre *et al*. (2011) trên cá tra cũng cho kết quả metHb trong máu cá tăng cao sau 24 giờ tiếp xúc. Nghiên cứu của Avilez *et al*. (2004) trên cá *Brycon cephalus* cho kết quả metHb tăng đến 90% sau 96 giờ tiếp xúc với nitrite ở nồng độ 0,4 mg/L N-NO_2 (tương đương 0,03 mM NO_2^-). Sự tăng cao của [NO_2^-] huyết tương (cao hơn 3 lần nitrite trong môi trường) là do cá tăng hấp thu ion NO_2^- qua mang khi tiếp xúc nitrite thông qua cơ chế trao đổi Cl^-/HCO_3^- ở mang cá nước ngọt được mô tả bởi Evans *et al.* (1999) và Jensen *et al*. (2000). Điều này được chứng minh qua sự giảm [Cl^-] ở Hình 4. Ở thí nghiệm này, cá được nuôi trong môi trường nước ngọt nên hàm lượng ion Cl^- trong môi trường thấp, ngược lại nồng độ NO_2^- trong môi trường cao, khi đó cá sẽ hấp thu ion NO_2^- qua mang thay vì hấp thu ion Cl^- (Bath and Eddy, 1980; Williams and Eddy, 1998). Cụ thể, ở thời điểm 24 giờ đến 48 giờ nitrite trong huyết tương tăng từ 0,69 mM lên 1,21 mM ở nghiệm thức 0,44 mM (Hình 3A), cùng thời điểm đó ion Cl^- huyết tương cũng giảm từ 96 mM xuống 93 mM (Hình 4).

Nghiên cứu này không hoàn toàn giống với nghiên cứu của Lefevre *et al*. (2011) trên cá tra, tác giả cho rằng nồng độ nitrite tích lũy trong huyết tương cá tăng cao nhất sau 1 ngày tiếp xúc nhưng không cao hơn nồng độ nitrite trong môi trường. Sự khác nhau này cũng thể hiện khả năng chịu đựng độc tố nitrite khác nhau giữa các loài cá. Có thể có cơ quan hô hấp phụ nên cá tra có khả năng chịu đựng độc tố nitrite cao hơn so với cá ba sa, loài hô hấp chủ yếu trong nước. Lefevre *et al*. (2011) cho biết cá tra có khả năng giảm trao đổi chất cơ bản (SMR) và tiêu hao oxy tối đa (maximum oxygen uptake (MO_2max)) khi tiếp xúc với nitrite, điều này đã làm giảm sự hấp thu nitrite vào máu cá. Trong nghiên cứu này, sau 48 giờ phần trăm metHb trong máu cá đã bắt đầu giảm xuống đồng thời nồng độ NO_2^- trong huyết tương của cá ba sa cũng giảm đến thời điểm 14 ngày. Sự giảm của MetHb và NO_2^- trong huyết tương của cá thể hiện sự thích nghi của cá khi sống trong môi trường có nitrite. Khi sống trong môi trường bị nhiễm độc nitrite cá có khả năng tự giải độc nitrite nhờ vào hoạt động của enzyme NADH-metHb reductase có trong hồng cầu, enzyme này sẽ chuyển metHb trong máu cá thành Hb và chuyển nitrite thành nitrate không độc, kết quả là làm giảm hàm lượng metHb và NO_2^- trong máu cá (Doblander and Lackner, 1996).

Ngoài các ảnh hưởng nêu trên, kết quả của nghiên cứu này còn cho thấy cá ba sa bị stress khi tiếp xúc với nitrite ở nồng độ 25% và 50% giá trị LC_{50}-96 giờ (0,22 mM và 0,44 mM NO_2^-) thể hiện qua sự gia tăng nồng độ glucose trong huyết tương. Nghiên cứu của Kroupova *et al.* (2008) trên cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) cũng cho thấy nồng độ glucose trong huyết tương của cá cũng tăng cao có ý nghĩa khi cho cá tiếp xúc với nitrite ngay cả ở nồng độ thấp 0,01; 0,1; 0,6; 1 và 3 mg/L NO_2^- (tương đương 0,0002; 0,0022; 0,013; 0,022 và 0,065 mM). Sự tăng lên của glucose thường đi kèm với sự tăng của cường độ trao đổi chất và đây là đáp ứng của cá khi bị stress (Barton, 1988). Hơn nữa sự tăng glucose là cần thiết để cung cấp năng lượng cho sự hoạt động của enzyme NADH-metHb reductase giải độc ở cá nhiễm nitrite

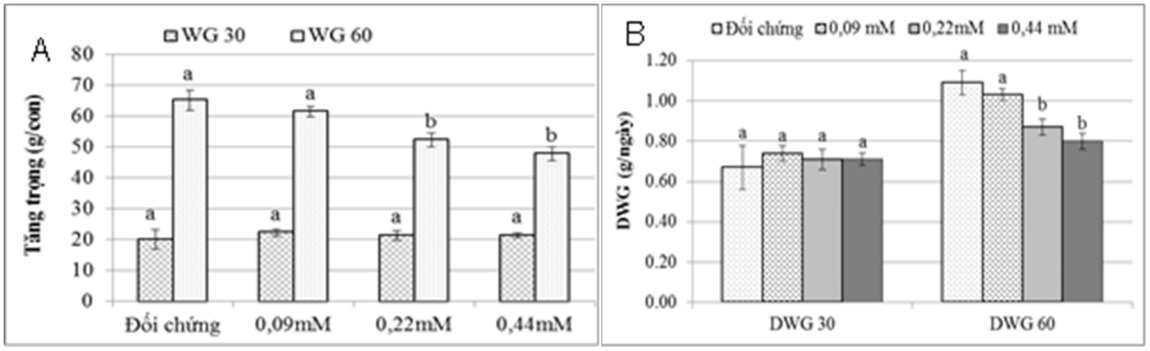
(Kroupova *et al*., 2008 trích dẫn từ Kiese, 1974). Nghiên cứu của Avilez *et al*. (2004) trên cá *Brycon cephalus* cho kết quả hoạt động của enzyme NADH- metHb reductase ở các nghiệm thức bổ sung nitrite cũng tăng lên để tăng cường sự giải độc cho cá.

3.2 Ảnh hưởng của nitrite lên tăng trưởng của cá ba sa

Thí nghiệm được bố trí trong trại có mái che và được sục khí liên tục do đó các yếu tố môi trường dao động không đáng kể. Trong đó, nhiệt độ dao động từ 27,33±0,21 đến 28,76±0,12ºC; oxy từ 4,87±0,19 đến 6,29±0,17 mg/L; pH từ 6,67±0,15 đến 6,80±0,02 và TAN từ 0,27±0,04 đến 0,39±0,06 mg/L. Các giá trị này đều nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của cá (Boyd, 1990), do đó không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm. Riêng nồng độ nitrite được kiểm tra mỗi ngày 2 lần và đạt các giá trị lần lượt là 0,04±0,004; 0,11±0,009; 0,23±0,018 và 0,43±0,009 mM tương ứng với các nghiệm thức đối chứng, 0,09 mM, 0,22 mM và 0,44 mM.

3.2.1 Tăng trọng, tốc độ tăng trưởng theo ngày (DWG) và tăng trưởng đặc biệt (SGR)

Tăng trọng (WG) của cá ba sa sau 30 ngày thí nghiệm không khác biệt nhiều giữa các nghiệm thức (Hình 5A). Tuy nhiên, sau 60 ngày thí nghiệm tăng trọng của cá ba sa đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (65,2±3,32 g). Tăng trọng của cá ở nghiệm thức 0,22 mM và 0,44 mM NO_2^- thấp hơn có ý nghĩa (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 0,09 mM NO_2^-.



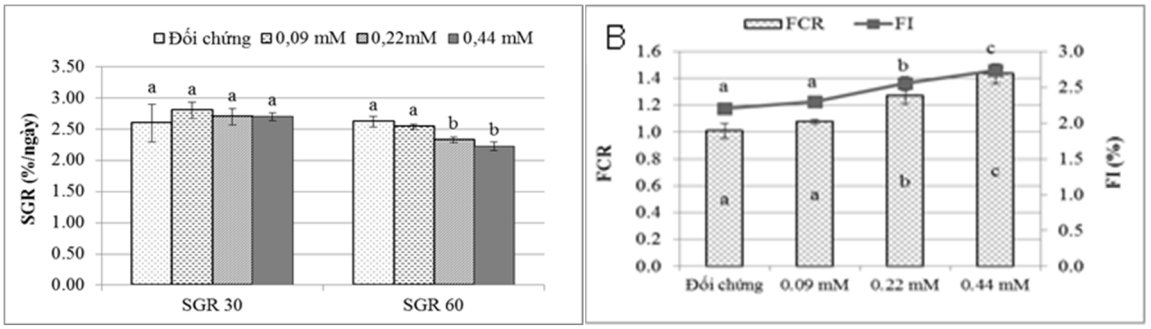
Hình 5: Tăng trọng (WG) (A) và tốc độ tăng trưởng theo ngày (DWG) (B) của cá ba sa

(Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) giữa các nghiệm thức trong cùng thời điểm thu mẫu)

Tương tự như WG, DWG và SGR của cá ở thời điểm 30 ngày giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05), DWG (Hình 5B) và SGR (Hình 6A) dao động tương ứng trong khoảng 0,67±0,11 đến 0,74±0,04 (g/ngày) và 2,60±0,3 đến 2,80±0,13 (%/ngày). Sau 60 ngày thí nghiệm, cả DWG và SGR của cá ba sa đã có sự thay đổi khá rõ rệt. Tốc độ tăng trưởng của cá đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng và giảm dần ở các nghiệm thức có nitrite. Cả DWG và SGR của cá ở nghiệm thức 0,22 mM và 0,44 mM giảm có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 0,09 mM.

3.2.2 Hệ số chuyển hóa thức ăn FCR và tỷ lệ sống

Hệ số FCR của cá ba sa sau 60 ngày nuôi tăng dần theo sự gia tăng của nồng độ nitrite và đạt cao nhất ở nghiệm thức 0,44 mM (1,44±0,08) khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với 3 nghiệm thức còn lại (Hình 6B). Hệ số FCR thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng (1,01±0,05) khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức 0,22 mM (1,26±0,06) nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức có nồng độ 0,09 mM (1,06±0,03). Lượng thức ăn cá sử dụng sau 60 ngày ở các nghiệm thức cũng gia tăng theo sự tăng của nitrite và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05) giữa nghiệm thức 0,22 mM và 0,44 mM NO_2^- so với đối chứng (Hình 6B). Tỷ lệ sống của cá ba sa sau 60 ngày giảm ở nồng độ nitrite cao. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) giữa các nghiệm thức. Tỷ lệ sống của cá ba sa đạt 100% ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 0,09 mM, ở nghiệm thức 0,22 mM là 98,33% và thấp nhất 88,3±11,8% ở nghiệm thức 0,44 mM.



Hình 6: Ảnh hưởng của nitrite đến SGR (A); lượng thức ăn sử dụng

(biểu đồ đường thẳng) và FCR (biểu đồ cột) (B) của cá ba sa (Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) giữa các nghiệm thức trong cùng thời điểm thu mẫu)

Kết quả nghiên cứu cho thấy trong thời gian 30 ngày đầu nitrite chưa có tác động rõ rệt lên tốc độ tăng trưởng của cá. Đến ngày thứ 60, sự ảnh hưởng của nitrite lên tốc độ tăng trưởng của cá đã thể hiện rõ, tăng trưởng của cá ba sa giảm thấp ở nồng độ nitrite cao (0,22 mM và 044 mM) là do các chỉ tiêu sinh lý của cá ở các nồng độ này thay đổi mạnh như hàm lượng metHb tăng cao làm cho nồng độ hemoglobin trong máu giảm thấp, vì vậy khả năng vận chuyển oxy của cá giảm, điều này làm giảm các hoạt động trong cơ thể cá. Ở nồng độ nitrite thấp 0,09 mM cá vẫn có khả năng chịu dựng và thích nghi nên tăng trưởng của cá không bị ảnh hưởng. Nghiên cứu của Voslářová *et al*. (2008) trên cá *Danio rerio* cũng cho kết quả tương tự, tăng trưởng của cá bị ức chế bởi nitrite ở nồng độ từ 2,3 mM (tương ứng với 25% LC_{50}-96h) khi so sánh với đối chứng. Theo Siikavuopio and Saether (2006) khi cho cá tuyết *Gadus morhua* tiếp xúc nitrite ở các nồng độ 0; 1; 2,5 và 5 mg/L NO_2-N (tương đương 0; 0,07; 0,18; 0,36 mM NO_2^-) thì tăng trưởng của cá giảm có ý nghĩa sau 31 ngày đầu tiếp xúc ở nồng độ nitrite cao 0,36 mM, và giảm ở tất cả các nghiệm thức còn lại khi tiếp xúc trong thời gian dài.

Kết quả ở Hình 6B cho thấy nồng độ nitrite cao (0,22 mM và 0,44 mM) làm tăng hệ số FCR của cá, ở các nghiệm thức này lượng thức ăn mà cá sử dụng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng nhưng tăng trưởng của cá thấp hơn. Điều này được giải thích là do trong quá trình nhiễm nitrite cá phải gia tăng nhu cầu năng lượng để hỗ trợ cho những thay đổi sinh lý bên trong cơ thể như điều hòa ion, hô hấp, tim mạch,... (Grosell and Jensen, 2000; Jensen, 2003). Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Kamtra *et al*. (1996) trên cá chình châu Âu, khi cho cá tiếp xúc với nitrite thì hệ số FCR của cá giữa các nghiệm thức cũng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa. Nghiên cứu của Frances *et al.* (1998) cho thấy FCR của cá tăng cao có ý nghĩa ở nghiệm thức có nồng độ nitrite cao nhất 1,17 mM NO_2^-.

Tỷ lệ sống của cá ba sa trong nghiên cứu này giảm ở nồng độ nitrite 0,22 mM và 0,44 mM nhưng không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Nghiên cứu trên cá chình châu Âu của Kamstra *et al*. (1996) cũng cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ sống giữa các mức nitrite trong thí nghiệm. Đối với cá silver perch, nghiên cứu của Frances *et al.* (1998) cho thấy tỷ lệ sống của cá không bị ảnh hưởng khi cho cá tiếp xúc với nitrite ở nồng độ lên đến 16,2 mg/L NO_2-N (tương đương 1,17 mM NO_2^-). Tuy nhiên, có một vài nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sống của cá bị giảm khi tiếp xúc với nitrite, Colt *et al.* (1981) cho rằng tỷ lệ sống của cá nheo Mỹ giảm khi tiếp xúc với nitrite ở nồng độ 3,71 mg/L NO_2-N (0,27 mM NO_2^-) (tương ứng với 32,3% LC_{50}-96h). Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thụy Vũ (2015) trên cá thát lát còm cũng cho thấy tỷ lệ sống của cá giảm khi tiếp xúc với nitrite ở nồng độ 0,39 mM và 3,91 mM NO_2^- (tương ứng 5% và 50% LC_{50}-96h). Hiện tượng cá chết chỉ xảy ở nồng độ nitrite cao, tập trung chủ yếu ở những ngày đầu và giảm dần về cuối thí nghiệm là do thời gian đầu tiếp xúc với nitrite metHb trong máu tăng cao làm giảm khả năng vận chuyển oxy của máu, vì vậy không cung cấp đủ oxy cho cá hoạt động dẫn đến cá chết ngạt (Đỗ Thị Thanh Hương và Lê Trần Tường Vi, 2013).

Tóm lại, tỷ lệ sống của cá không bị ảnh hưởng bởi các nồng độ nitrite trong thí nghiệm nhưng tăng trưởng, FCR và các chỉ tiêu sinh lý của cá bị ảnh hưởng ở nồng độ từ 0,22 mM NO_2^- trở lên điều này cũng chỉ ra được sự nhạy cảm của cá ba sa đối với nitrite ở nồng độ dưới ngưỡng gây chết.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Cá ba sa tiếp xúc với nitrite làm tăng nồng độ metHb và [NO_2^-] trong máu cá theo sự tăng của nồng độ nitrite trong môi trường. Đây là hai chỉ

tiêu sinh lý bị ảnh hưởng mạnh nhất và có thể sử dụng như chất chỉ thị để đánh giá khi cá bị nhiễm nitrite. Nồng độ nitrite trong nước là 0,09 mM sẽ không ảnh hưởng đến tăng trưởng của cá ba sa. Tỷ lệ sống của cá không bị ảnh hưởng bởi nồng độ nitrite trong thí nghiệm.

Trong ao ương cá ba sa, hàm lượng nitrite cần kiểm soát dưới 0,09 mM để đảm bảo cho cá phát triển tốt. Nghiên cứu về hoạt tính của enzyme metHb reductase trên cá là cần thiết để hiểu rõ hơn sự thích nghi và khả năng tự giải độc của cá khi tiếp xúc với nitrite.

LỜI CẢM TẠ

Tác giả xin chân thành cảm ơn Dự án iAQUA - tổ chức DANIDA đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Avilez, I.M., Altran, A.E., Aguiar, L.H. and Moraes, G., 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxa˜ (Brycon cephalus) to environmental nitrite. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 139 (1-3): 135–139.

Barton, B.A., 1988. Endocrine and metabolic responses of fish to stress. Int. Assoc. Aquat. Anim. Med. Proc. 19: 41–55.

Bath, R.N. and Eddy, F.B., 1980. Rapid Communication Transport of Nitrite Across Fish Gills. Journal of Experimental Zoology. 214 (1): 119 – 121.

Boyd C.E. and Tucker, C.S., 1990. Pond Aquaculture Water Quality Management. 700 pages.

Cacot, P., Eeckhoutte, P., Muon, D.T., Trieu, N.V., Legendre, M., Mariojouls, C. and Lazard, J., 2003. Induced spermiation and milt management in Pangasius bocourti (Sauvage, 1880). Aquaculture. 215 (1–4): 67-77.

Cacot, P., Legendre, M., Dan, T.Q., Tung, L.T., Liem, P.T., Mariojouls, C. and Lazard, J., 2002. Induced ovulation of Pangasius bocourti (Sauvage, 1880) with a progressive hCG treatment. Aquaculture. 213 (1–4): 199-206.

Colt. J., Ludwig, R., Tchobanoglous, G. and Cech, J., 1981. The effects of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish, Ictalurus punctatus. Aquaculture. 24: 111 – 122.

Đỗ Thị Thanh Hương và Lê Trần Tường Vi, 2013. Ảnh hưởng của nitrit lên một số chỉ tiêu huyết học và tăng trưởng của cá lóc (Channa striata). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: 27 (2013): 154-160.

Doblander, C. and Lackner, R., 1996. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1289 (2): 270-274.

Evans, D.H., Piermarini, P.M. and Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology. 283(7): 641–652

Frances, J., Allan, G.L. and Nowak, B.F., 1998. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (Bidyanus bidyanus). Aquaculture. 163(1-2): 63 – 72.

Francis-Floyd, R., C. Watson, D. Petty, and D.B. Pouder, 2015. Ammonia in Aquatic Systems. University of Florida/IFAS Extension.

Grosell, M. and Jensen, F.B., 2000. Uptake and effects of nitrite in marine teleost fish Platichthys flesus. Aquatic Toxicology. 50 (1-2): 97–107.

Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. Aquaculture. 166 (3-4): 181–212.

Hugget, A.S.G. and Nixon, D.A., 1957. Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. The Lancet. 270 (6991): 368-370.

Hung, L.T., Suhenda, N., Slembrouck, J., Lazard, J. and Moreau, Y., 2004. Comparison of dietary protein and energy utilization in three Asian catfishes (Pangasius bocourti, P. hypophthalmus and P. djambal). Aquaculture Nutrition. 10 (5): 317-326.

Jensen, B.F., Koldkjær, P. and Bach, A., 2000. Anion uptake and acid-base and ionic effects during isolated and combined exposure to hypercapnia and nitrite in the freshwater crayfish, Astacus astacus. Journal of Comparative Physiology B. 170 (7): 489-495.

Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 135 (1): 9-24.

Jensen, F.B., 2009. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1787(7): 841-848.

Kamstra, A., Span, J. A and Weerd, J.H.V., 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, Anguilla anguilla (L.). Aquaculture Research. 27 (12): 903-911.

Kosaka, H. and Tyuma, I., 1987. Mechanism of Autocatalytic Oxidation of Oxyhemoglobin by Nitrite. Environmental Health Perspectives. 73: 147-151.

Kroupova, H., Machova, J., Piackova, V., Blahova, J., Dobsikova, R., Novotny, L. and Svobodova, Z., 2008. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Ecotoxicology and Environmental Safety. 71(3):813–820.

Kroupova, H., Machova, J. and Svobodova, Z., 2005. Nitrite influence on fish: a review. Vet. Med. Czech. 50 (11): 461–471.

Lefevre, S., Jensen, F.B., Huong, D.T.T., Wang, T., Phuong, N.T. and Bayley, M., 2011. Effects of nitrite exposure on functional haemoglobin levels, bimodal respiration, and swimming performance in the facultative air-breathing fish Pangasianodon hypophthalmus. Aquatic Toxicology. 104 (1-2): 86–93.

Lewis, W.M. and Morris, D.P., 1986. Toxicity of nitrite to fish: A Review. Transactions of the American Fisheries Society. 115 (2): 183–195.

Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A., 2001. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide. 5 (1): 62–71.

Nguyễn Thị Thụy Vũ, 2015. Ảnh hưởng của nitrite lên chỉ tiêu sinh lý máu và tăng trưởng của cá thát lát còm (Chitala chitala Hamilton, 1822) giống. Luận văn tốt nghiệp cao học ngành Nuôi trồng thủy sản. Trường Đại học Cần Thơ.

Phạm Văn Khánh, 2004. Kỹ thuật nuôi một số loài cá xuất khẩu. Nhà xuất bản Nông nghiệp TPHCM.

Siikavuopio, S. and Saether, B., 2006. Effects of chronic nitrite exposure on growth in juvenile Atlantic cod, Gadus morhua. Aquaculture. 255 (1-4): 351-356.

Voslářová, E., Pištěková, V., Svobodová, Z. and Bedáňová, I., 2008. Nitrite Toxicity to Danio rerio: Effects of Subchronic Exposure on Fish Growth. Acta Veterinaria Brno. Journal of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno, Czech Republic. 77: 455–460.

Williams, E.M. and Eddy, F.B., 1998. Anion transport, chloride cell number and nitrite induced methaemoglobinaemia in rainbow trout (Salmo gairdnerl) and carp (Cyprinus carpio). Aquatic Toxicology. 13 (1): 29-42.