

Bài 1. CÁC CHỈ TIÊU MÁU

1. Mục đích

Việc xác định các chỉ tiêu máu thông qua đó hiểu biết trạng thái sinh lý của cơ thể và ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đối với các đối tượng nuôi là rất cần thiết cho các nhà nuôi cá.

2. Nội dung thực tập

Các chỉ tiêu máu bao gồm:

- Số lượng hồng cầu: đơn vị tính 10^6 HC/mm³
- Số lượng bạch cầu: đơn vị tính 10^3 BC/mm³
- Hàm lượng hemoglobin (Hb): đơn vị tính g/100 mL (g%) hay %
- Hematocrit (%)
- Thể tích trung bình hồng cầu (MCV): femtolit ($1 \text{ fL} = 10^{-15}$ lít)
- Khối lượng hemoglobin trung bình của một hồng cầu (MCH): picogram ($1 \text{ pg} = 10^{-12}$ g)
- Nồng độ hemoglobin trung bình của một hồng cầu (MCHC): g/dL (g/L)

3. Thực hiện

Số lượng hồng cầu

+ Hóa chất

- Chất chống đông máu: EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)
- Dung dịch pha loãng máu: dung dịch Dacies

+ Dụng cụ

- Buồng đếm HC và BC: buồng đếm Neubauer
- Pipette HC (Red pipette)
- Pipette BC (White pipette)
- Kính hiển vi

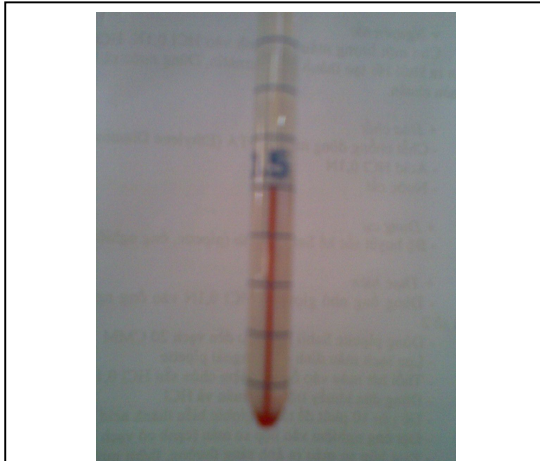
+ Thực hiện

- Lấy máu ở động mạch chủ lưng hay động mạch cuống đuôi
- Mở cá, bộc lộ động mạch chủ lưng
- Đưa kim tiêm đã có chất kháng đông vào động mạch chủ lưng (hay động mạch cuống đuôi, không cần mổ cá) và rút máu ra, cho mẫu máu không đông vào dụng cụ chứa
- Hút máu đến vạch 0.5 của pipette HC
- Lau sạch máu dính ở đầu dưới pipette
- Hút dung dịch pha loãng đến vạch 101 (máu được pha loãng 200 lần)
- Xoay pipette theo hình số 8 trong 2 phút
- Bỏ đi 2-3 giọt dung dịch pha loãng ở đầu pipette
- Đặt 1 lamelle lên buồng đếm máu

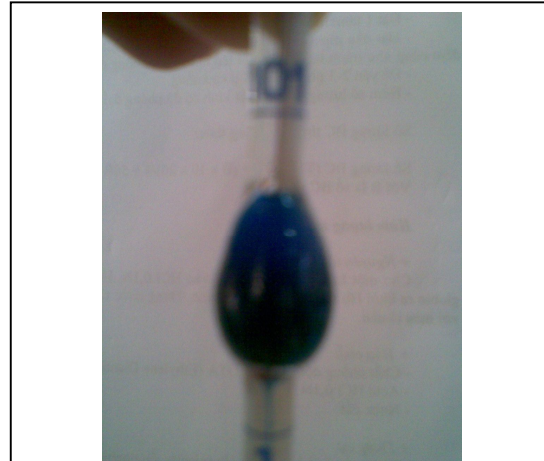


H.1 Buồng đếm neubauer với các pipette hồng cầu (red pipette) và pipette bạch cầu (white pipette)

- Đặt đầu pipette chạm nhẹ vào cạnh của lamelle (tránh bọt khí trong vùng buồng đếm cũng như tránh lamelle bị đội lên khỏi cạnh buồng đếm)
- Để yên 2-3 phút cho HC lắng xuống
- Đếm số lượng HC với vật kính có độ phóng đại 10 hay 40 ở 5 ô nhỏ (4 ô ở góc và 1 ô ở giữa của ô lớn đếm HC)



H.2 Hút máu đến vạch 0.5 của pipette hồng cầu (red pipette)

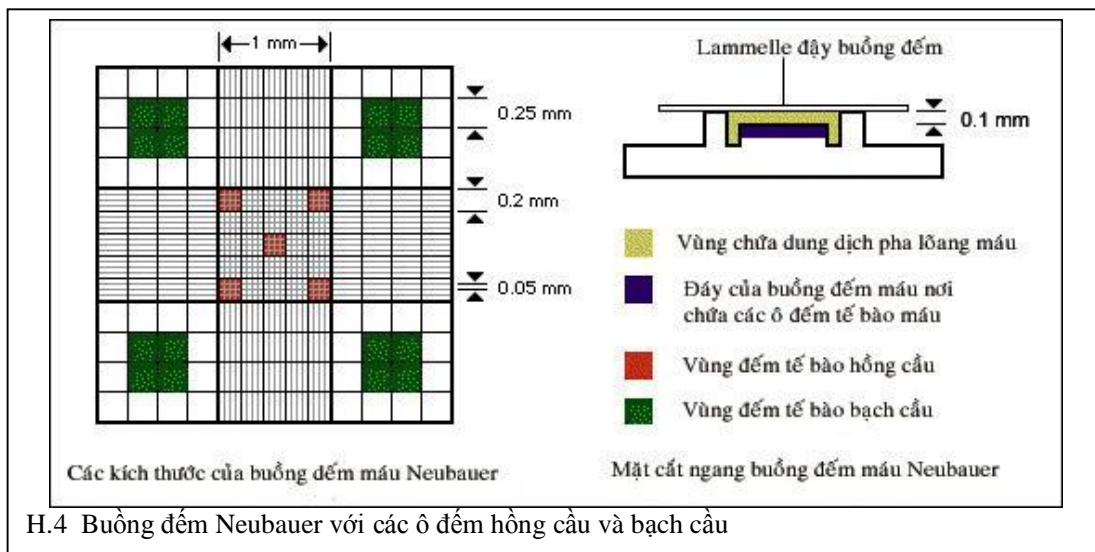


H.3 Hút dung dịch pha loãng đến vạch 101 của pipette hồng cầu (red pipette)

Số lượng HC tính theo công thức:

$$\text{Số lượng HC (TB/mm}^3\text{)} = A \times 5 \times 10 \times 200 = 10.000A$$

Với A là số HC đếm được



H.4 Buồng đếm Neubauer với các ô đếm hồng cầu và bạch cầu

Số lượng bạch cầu

+ Thực hiện

- Hút máu đến vạch 0.5 của pipette BC
- Lau sạch máu dính ở đầu dưới pipette
- Hút dung dịch pha loãng đến vạch 11 (máu được pha loãng 20 lần)
- Xoay pipette theo hình số 8 trong 2 phút

- Bỏ đi 1-2 giọt dung dịch pha loãng ở đầu pipette
- Đặt 1 lamelle lên buồng đếm máu
- Đặt đầu pipette chạm nhẹ vào cạnh của lamelle (tránh bọt khí trong vùng buồng đếm cũng như tránh lamelle bị đội lên khỏi cạnh buồng đếm)
- Để yên 2-3 phút cho BC lắng xuống
- Đếm số lượng BC với vật kính có độ phóng đại 10 hay 40 ở 4 ô lớn đếm BC

Số lượng BC tính theo công thức:

$$\text{Số lượng BC (TB/mm}^3\text{)} = (B \times 10 \times 20)/4 = 50B$$

Với B là số BC đếm được

Hàm lượng hemoglobin

+ Nguyên tắc

Cho một lượng máu xác định vào HCl 0,1N. HCl tác dụng lên Hb đồng thời tách globin ra khỏi Hb tạo thành acid hematin. Dùng nước cất pha loãng cho đến khi cùng màu với màu chuẩn.

+ Hóa chất

- Chất chống đông máu: EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)
- Acid HCl 0,1N
- Nước cất

+ Dụng cụ

- Bộ huyết sắc kế Sahli đo Hb (pipette, ống nghiệm, hộp so màu)

+ Thực hiện

- Dùng ống nhỏ giọt cho HCl 0,1N vào ống nghiệm đến khi mặt cong trùng với vạch số 2

- Dùng pipette Sahli hút máu đến vạch 20 CMM

- Lau sạch máu dính ở bên ngoài pipette

- Thổi hết máu vào ống nghiệm chứa sẵn HCl 0,1N, tráng pipette 2-3 lần

- Dùng thìa khuấy trộn đều máu và HCl

- Để yên 10 phút để tất cả globin biến thành acid hematin

- Đặt ống nghiệm vào hộp so màu (tránh cạnh có vạch số ở phía trước)

- Đưa hộp so màu ra ánh sáng thường, thêm nước cất vào ống nghiệm cho đến khi màu trong ống nghiệm trùng với màu chuẩn 2 bên rồi đọc kết quả (trùng với mặt cong dưới).



H.5 Bộ huyết sắc kế Sahli (bao gồm 1 pipette, 1 ống nghiệm, 1 thìa khuấy và 1 hộp so màu)

Hematocrit (Hct)

+ Thực hiện

Cho một lượng máu vào ống mao dẫn (hematocrit capillary) và ly tâm ở tốc độ cao (11000-12000 vòng/phút) trong ít nhất 5 phút. Đặt ống mao dẫn lên bảng đọc hematocrit (hematocritmeter) và đọc trị số.

Thể tích trung bình hồng cầu (MCV)

MCV được tính bằng công thức:

$$\mathbf{MCV} = \text{Hct}/\text{số lượng hồng cầu}$$

Giá trị MCV cho phép phân biệt các loại thiếu máu.

Khối lượng hemoglobin trung bình của 1 hồng cầu (MCH)

MCH được tính theo công thức:

$$\mathbf{MCH} = \text{Hb}/\text{số lượng hồng cầu}$$

Nồng độ hemoglobin trung bình của 1 hồng cầu (MCHC)

MCHC được tính theo công thức:

$$\mathbf{MCHC} = \text{Hb}/\text{Hct}$$

MCHC cho phép phân biệt thiếu máu.

Bài 2. CÁC CHỈ TIÊU TRAO ĐỔI KHÍ

1. Mục đích

Việc xác định cường độ trao đổi chất, thông qua đó hiểu biết về trạng thái sinh lý của cơ thể, ảnh hưởng của các yếu tố môi trường và đánh giá tốc độ sinh trưởng của các đối tượng nuôi là rất cần thiết cho các nhà nuôi cá.

Cụ thể:

- Khi đói cường độ trao đổi chất giảm xuống
- Khi nhiệt độ tăng cường độ trao đổi chất tăng
- Cùng một đối tượng nuôi trong cùng một điều kiện môi trường với nhiều công thức thức ăn khác nhau, một công thức thích hợp nhất về dinh dưỡng (số lượng và chất lượng) sẽ làm cho đối tượng nuôi có cường độ trao đổi chất lớn nhất và tốc độ sinh trưởng cao nhất.

Để có thể so sánh trạng thái sinh lý và cường độ trao đổi chất của cơ thể dưới ảnh hưởng của những yếu tố môi trường trong và ngoài, người ta dùng khái niệm trao đổi chất cơ sở; đó là quá trình trao đổi chất trong những điều kiện:

- Cơ thể ở trạng thái tương đối yên tĩnh
- Không có thức ăn trong đường ruột
- Nhiệt độ tối thích hợp
- Thần kinh không căng thẳng

Như vậy năng lượng cần thiết cho quá trình trao đổi chất cơ sở là năng lượng dùng để duy trì những hoạt động sống cơ bản như hoạt động tuần hoàn, hô hấp, v.v.

Để xác định cường độ trao đổi chất của động vật người ta áp dụng hai phương pháp trực tiếp và gián tiếp.

- Phương pháp trực tiếp: cơ thể lấy năng lượng từ quá trình thiêu đốt thức ăn. Quá trình này sản xuất ra nhiệt cho nên năng lượng tiêu hao của cơ thể có thể xác định bằng cách đo nhiệt lượng sinh ra trong một thời gian nhất định.

Phương pháp này thường được áp dụng cho động vật đẳng nhiệt như người, sử dụng phòng nhiệt lượng kế.

- Phương pháp gián tiếp: quá trình thiêu đốt thức ăn trong cơ thể là quá trình oxy hóa các dưỡng chất. Quá trình này đòi hỏi oxygen và thải ra CO₂. Phương pháp gián tiếp là phương pháp đo oxygen tiêu thụ của cơ thể trong một thời gian nhất định.

Phương pháp này đơn giản và chính xác nên được áp dụng cho hầu hết động vật. Cá và giáp xác là những động vật thủy sinh biến nhiệt nên thường áp dụng phương pháp gián tiếp để đánh giá cường độ trao đổi chất của chúng.

2. Nội dung thực tập

Các chỉ tiêu trao đổi khí bao gồm:

- Tiêu hao oxygen: là lượng oxygen tiêu thụ bởi cơ thể cá/giáp xác trong một đơn vị thời gian. Đơn vị tính: mg hay mL O₂/kg.giờ.

- Tần số hô hấp: là chu kỳ hô hấp của cá/giáp xác trong một đơn vị thời gian. Đơn vị tính: lần/phút.

- Nguỡng oxygen: là hàm lượng oxygen trong nước tối thiểu mà cá/giáp xác có thể sống được. Đơn vị tính: mg hay mL O₂/L.

3. Thực hiện

Đo tiêu hao oxygen

Có 2 phương pháp:

- Phương pháp nước chảy: cho một dòng nước có lưu tốc nhất định qua một dụng cụ chứa cá. Trắc định oxygen của nước trước (oxygen ban đầu) và sau (oxygen cuối) khi qua dụng cụ chứa cá, từ đó tính ra tiêu hao oxygen.

Phương pháp này có ưu điểm: nhanh, nhưng có hạn chế: dụng cụ phức tạp và không xác định được tiêu hao oxygen cơ sở do cá vận động liên tục.

- Phương pháp bình kín: cho cá/giáp xác vào một bình kín, trắc định oxygen đầu (trước khi thả cá/GX), sau một thời gian nhất định trắc định oxygen cuối.

Phương pháp này có ưu điểm: dụng cụ đơn giản, xác định được cường độ trao đổi chất cơ sở nhưng khuyết điểm là chậm.

+ *Hóa chất*

- Các hóa chất trắc định oxygen (MnSO₄, IK kiềm, H₂SO₄ đđ, Na₂S₂O₃)

+ *Dụng cụ*

- Bình kín chứa cá/GX, lọ winkler, bình tam giác 100 mL, ống đong, bình chuẩn 50 mL, pipette các loại.

+ *Điều kiện*

- Nước sử dụng chứa cá không chứa các chất độc hại

- Cá/GX phải được giới thiệu với điều kiện thí nghiệm trước

+ *Thực hiện*

- Cho nước vào đầy bình chứa

- Cho cá/GX nhẹ nhàng vào bình, đậy nắp thật kín (không có bọt khí)

- Lấy 1 mẫu nước từ bể chứa nước vào lọ winkler để đo oxygen đầu (O₂ đ)

- Sau 1 giờ (t), mở nắp bình kín và lấy 1 mẫu nước vào lọ winkler để đo oxygen cuối (O₂ c)

- Đo thể bình (Vb) và thể tích cá (Vc)

- Cân trọng lượng cá (P)

- Xác định tiêu hao oxygen theo công thức:

Tiêu hao oxygen (mg O ₂ /kg.giờ)	$\frac{(O_2 \text{ đ} - O_2 \text{ c}) \times (Vb - Vc)}{P \times t}$
--	---

Trong đó: O₂ đ: oxygen ban đầu (mg/L)

O₂ c: oxygen cuối (mg/L)

Vb: thể tích bình (L)
 Vc: thể tích cá (L)
 P: trọng lượng cá (kg)
 t: thời gian (giờ)

Trong công thức này hàm lượng oxygen có thể tính là mL/L (1 mg O₂ = 0,70 mL O₂)

Chú ý: khi trình bày kết quả cần cho biết các điều kiện môi trường như nhiệt độ và pH

Đo ngưỡng oxygen và tần số hô hấp

+ *Thực hiện*

- Cho nước vào đầy bình chứa
- Cho cá/GX nhẹ nhàng vào bình, đậy nắp thật kín (không có bọt khí)
- Khi cá yên tĩnh (sau 15 phút), đếm số lần đóng mở nắp mang (TSHH) trong 1 phút (đếm 3 lần)
- Khi cá/GX chết, lấy mẫu nước vào lọ winkler để đo oxygen

Ghi chú:

Trắc định oxygen theo các bước sau:

- Cho 0,5 mL MnSO₄ vào lọ winkler có chứa mẫu nước đo oxygen
- Thêm 0,5 mL IK kiềm (thấy xuất hiện kết tủa)
- Đậy nắp lọ winkler và lắc đều
- Thêm 1 ml H₂SO₄ đđ (kết tủa bị tan ra)
- Dùng bình chuẩn lấy ra 50 ml từ lọ winkler và cho vào bình tam giác 125 ml
- Chuẩn độ mẫu nước này với Na₂S₂O₃ 0,025N cho đến khi mất màu (với chất chỉ thị là hồ tinh bột)
- Hàm lượng oxygen hòa tan được tính theo công thức:

Oxygen hòa tan (mg O ₂ /L)	$8 * N * V * 1000$
	50

Trong đó:

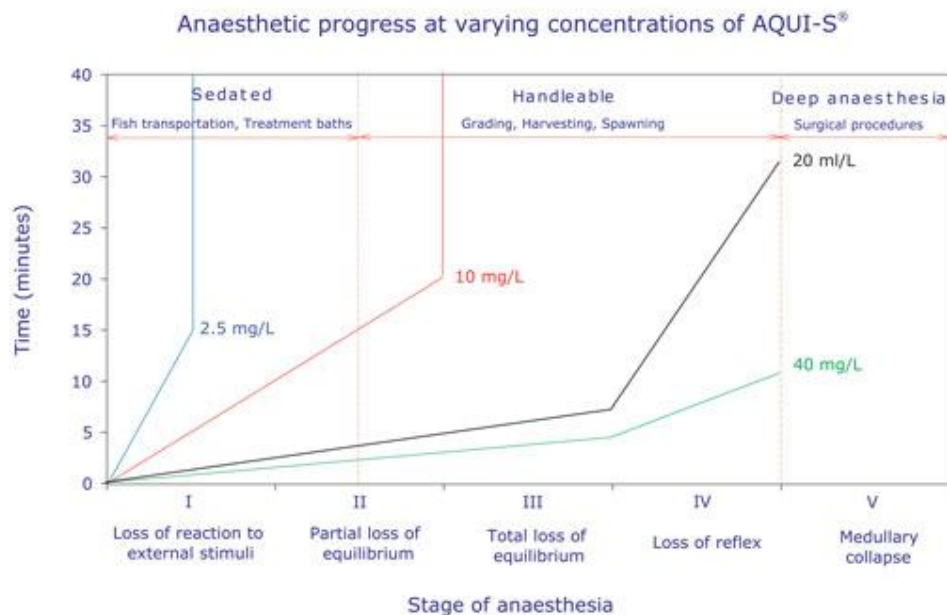
N : nồng độ Na₂S₂O₃ (ở đây là 0,025)

V : thể tích Na₂S₂O₃ (mL) đã dùng

Bài 3. GÂY MÊ CÁ

1. Giới thiệu

Gây mê cá là một quá trình liên tục từ mất cảm giác nhẹ đến suy sụp thần kinh (chết). Nói chung có 5 giai đoạn trong gây mê của cá. Tuy nhiên, trong thực tiễn nuôi cá người ta chia ra 3 trạng thái mê: làm dịu (sedation), có thể quản lý được (handleable) và hôn mê sâu (deep anaesthesia).



Làm dịu (sedation)

- Trạng thái yên tĩnh (làm dịu): hấp thu chất gây mê = làm sạch biển dưỡng
- Trạng thái yên tĩnh này thì lý tưởng cho hoạt động vận chuyển trong vài giờ.

Có thể quản lý được (handleable)

- Liên tục gây mê: hấp thu chất gây mê \geq làm sạch biển dưỡng
- Một nồng độ mà làm con vật có thể quản lý là lý tưởng cho hoạt động thu hoạch, phân cỡ và vượt sản phẩm sinh dục vì con vật không có phản ứng.

Hôn mê sâu (deep anaesthesia)

- Liên tục gây mê: hấp thu chất gây mê $>$ làm sạch biển dưỡng
- Khi nồng độ được gia tăng khả năng quản lý con vật cho các hoạt động nuôi thủy sản bị giảm.

Có nhiều chất gây mê

MS222 (tricaine methane sulphonate) là sản phẩm duy nhất được phép sử dụng trên cá. MS222 có dạng bột trắng có thể hòa tan trong nước, ổn định khi giữ lạnh và khô. Đây là dẫn xuất của benzocaine. Một dung dịch stock chuẩn là pha 10 g tricaine thành 1 lít nước và đựng trong chai màu tối vì nó không bền dưới ánh sáng mặt trời. Dung dịch MS222 có tính acid và vì vậy dung dịch gây mê cần phải kiểm tra pH trước khi dùng.

Trong nước có tính đệm thấp cần sử dụng sodium bicarbonate duy trì pH khoảng 7 – 7,5 cho dung dịch stock chuẩn.

MS222 là một chất gây thiếu oxygen, vì thế cần sục khí mạnh khi dùng. Tricaine thường được dùng ở nồng độ 50 – 100 mg/L, nghĩa là thêm 5 – 10 mL dung dịch stock chuẩn cho 1 lít nước dùng gây mê cá. Cá nên được hồi phục trong vòng 10 phút.

2. Mục đích

Xác định các nồng độ gây mê trên cá để phục vụ cho các mục đích khác nhau như vận chuyển cá, thu hoạch, phân cỡ và thu sản phẩm sinh dục trong sinh sản nhân tạo.

3. Thực hiện

Xác định trạng thái mê

+ *Hóa chất*

- MS222

+ *Dụng cụ*

- Bình nhựa 1 L

+ *Thực hiện*

- Pha MS222 với các nồng độ 0,2 và 0,4 ppt

- Cho cá nhẹ nhàng vào bình có thuốc gây mê

- Theo dõi phản ứng của cá: màu sắc, hô hấp, bơi lội, phản ứng với tác động bên ngoài,...

Đo tiêu hao oxygen sau khi xử lý cá với thuốc gây mê

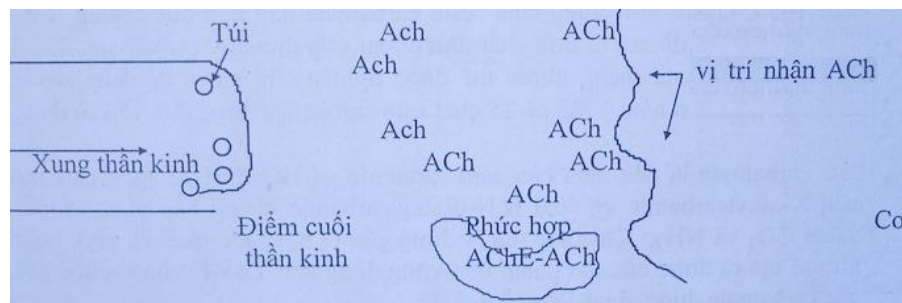
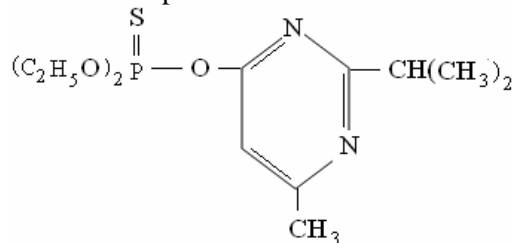
(Thực hiện như đo tiêu hao oxygen ở Bài 2)

Bài 4. ẢNH HƯỞNG CỦA THUỐC TRỪ SÂU

1. Giới thiệu

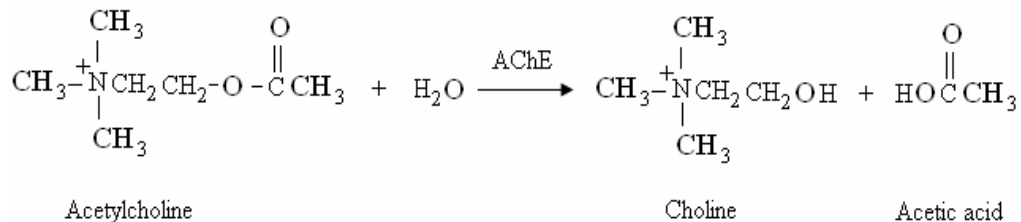
Ngày nay, việc sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật trong nông nghiệp đã đem lại những vụ mùa bội thu cho các hộ nông dân. Bên cạnh đó, việc sử dụng tràn lan, không đúng cách, không đúng liều lượng các loại thuốc này, đã góp phần gia tăng dư lượng thuốc trong đất, nước, không khí,... Các loại thuốc này đã ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển và làm bùng phát dịch bệnh của các loài thủy sản trong khu vực đã nhiễm thuốc.

Cấu trúc phân tử diazinon như sau:



Hình 2.4: Sự tương tác giữa AChE và ACh tại chỗ nối synapse hoặc cơ thần kinh

Khi xung thần kinh di chuyển dọc theo trục và tiến đến điểm cuối của nối synapse hoặc cơ thần kinh, các ACh có sẵn trong các túi sẽ được phóng thích ra ngoài nhanh chóng, sau đó tương tác với màng sau synaptic gây kích thích cơ hoặc sợi thần kinh. AChE điều chỉnh sự truyền thần kinh bằng cách giảm nồng độ ACh tại chỗ nối bằng phản ứng thủy phân enzyme, biến ACh thành choline và acid acetic.



Theo Elnwisy và *ctv.* (2007), tổng số AChE hoạt động trong não cá giảm đáng kể khi có mặt của diazinon trong môi trường nước. Não bộ điều hòa các xung động thần kinh của cơ thể cá bằng AChE, nhưng AChE đã bị bất hoạt bởi diazinon, cho nên cá có dấu hiệu quá mức kiểm soát (phù mang). Ngoài ra trong cơ thể cá, diazinon có thể biến đổi thành diazoxon – chất ức chế AChE rất mạnh (Eisler, 1986) và độc lực có thể tăng gấp 20 lần độc lực của diazinon (Tsuda và *ctv.*, 1997; trích bởi Elnwisy và *ctv.*, 2007). Hơn nữa,

diazinon còn làm giảm giá trị haematocrit và lượng haemoglobin của hồng cầu (Sweilum, 2006) là nguyên nhân gây thiếu oxy cho cá; từ đó kích thích cá tăng cường hô hấp và tăng cường đưa máu đến mang. Sự bế tắc ở mang do lượng hồng cầu đưa đến quá nhiều là một điều không thể tránh khỏi, điều đó làm mang xậm màu và càng xậm hơn khi nồng độ thuốc trừ sâu tăng lên.

2. Mục đích

Xác định ảnh hưởng độc cấp tính của thuốc trừ sâu đến cá nuôi.

3. Nội dung thực tập

- + Khảo sát ảnh hưởng của thuốc trừ sâu đến hoạt động sống của cá:
 - Nhận xét sự thay đổi màu sắc của cá
 - Theo dõi hoạt động sống của cá: hô hấp, bơi lội, phản ứng với những kích thích bên ngoài
 - Xác định ngưỡng oxygen của cá trong môi trường có thuốc

4. Thực hiện

- + Mẫu vật và thuốc trừ sâu
 - Cá rô phi giống
 - Thuốc trừ sâu Diazan 10H (thuộc nhóm lân hữu cơ) có chứa hoạt chất diazinon 10%

- + Dụng cụ
 - Bình nhựa 1 L

- + Thực hiện
 - Pha thuốc với các nồng độ khác nhau (**cần có thăm dò trước**)
 - Cho cá nhẹ nhàng vào bình có thuốc trừ sâu
 - Theo dõi phản ứng của cá: màu sắc, hô hấp, bơi lội, phản ứng với tác động bên ngoài,...

Đo tiêu hao oxygen sau khi xử lý cá với thuốc trừ sâu
(Thực hiện như đo tiêu hao oxygen ở Bài 2)

- Khi cá chết, khảo sát sự thay đổi ở cơ quan như mang, sự tiết nhầy, màu sắc,...