



DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.057

## ẢNH HƯỞNG CỦA CO<sub>2</sub> VÀ NITRIT CAO TRONG MÔI TRƯỜNG LÊN KHẢ NĂNG ĐIỀU HÒA ACID VÀ BASE CỦA LƯƠN ĐỒNG (*Monopterus albus*, 1793)

Phan Vinh Thịnh<sup>1,2</sup>, Huỳnh Thị Ngọc Linh<sup>3</sup>, Đỗ Thị Thanh Hương<sup>1</sup> và Nguyễn Thanh Phương<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Vườn ươm Công nghệ Công nghiệp Việt Nam – Hàn Quốc, Sở Khoa học Công nghệ Cần Thơ

<sup>3</sup>Sở Khoa học Công nghệ Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thanh Phương (email: ntphuong@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/10/2022

Ngày nhận bài sửa: 07/02/2022

Ngày duyệt đăng: 22/04/2022

### Title:

Effects of hypercapnia and high nitrite on acid-base regulation of swamp eel (*Monopterus albus*, 1793)

### Từ khóa:

Điều hòa acid và base, CO<sub>2</sub>, lươn đồng, nitrit, pH máu

### Keywords:

Acid-base regulation, CO<sub>2</sub>, blood pH, nitrite, swamp eel

### ABSTRACT

The effects of CO<sub>2</sub> and nitrite on aquatic animals have been documented. Swamp eel (*Monopterus albus*) is an air-breathing fish that is commonly farmed in the Mekong Delta of Viet Nam. This species could be affected by high CO<sub>2</sub> and nitrite caused by climate change and intensive farming, respectively. The study on the single and combination of hypercapnia and high nitrite on acid-base regulation on swamp eel (250-350 g/eel) was carried out in 4 treatments including 30mmHg CO<sub>2</sub>, 23.57 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 30mmHg CO<sub>2</sub> + 23.57 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and a control treatment with 6 replications. After 96 hours of experiment, it showed that the combined penetration of hypercapnia and nitrite prevents the pH blood recovery of swamp eels (decrease of pH blood), the concentrations of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> ions, and osmotic pressure were reduced. However, swamp eels still can regulate acid-base in the blood as well as regulate ions when being penetrated by nitrite due to an indirect Cl<sup>-</sup> ion-exchange mechanism (reducing Cl<sup>-</sup> ions through HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> exchange).

### TÓM TẮT

Ảnh hưởng của CO<sub>2</sub> và nitrite lên động vật thủy sản đã có nhiều công bố khoa học. Lươn đồng (*Monopterus albus*) là loài hô hấp khí trời được nuôi phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Lươn đồng có thể bị ảnh hưởng bởi CO<sub>2</sub> tăng do tác động của biến đổi khí hậu và nitrite cao do nuôi thâm canh. Nghiên cứu ảnh hưởng đơn và kết hợp CO<sub>2</sub> với nitrite cao lên khả năng điều hòa acid và base trên lươn đồng (250-350 g/con) được thực hiện với 4 nghiệm thức gồm 30 mmHg CO<sub>2</sub>, 23,57 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 30 mmHg CO<sub>2</sub> + 23,57 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> và đối chứng, mỗi nghiệm thức được lặp lại 6 lần. Sau 96 giờ thí nghiệm, kết quả cho thấy sự xâm nhập kết hợp CO<sub>2</sub> và nitrite gây cản trở quá trình phục hồi pH máu của lươn đồng (pH máu giảm), nồng độ các ion Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> và áp suất thẩm thấu đều giảm. Tuy nhiên, lươn đồng vẫn có khả năng điều hòa acid và base trong máu cũng như điều hòa các ion khi bị nitrite xâm nhập nhờ cơ chế trao đổi ion Cl<sup>-</sup> gián tiếp (giảm ion Cl<sup>-</sup> qua sự trao đổi HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>).

## 1. GIỚI THIỆU

Lươn đồng (*Monopterus albus*) là loài hô hấp khí trời bắt buộc, được nuôi phổ biến ở vùng đồng bằng sông Cửu Long. Lươn đồng phân bố rộng ở khu vực Đông Nam Á (Rosen & Greenwood, 1976). Trong tự nhiên, lươn đồng thường sống ở những nơi nước tĩnh, thiếu oxy, nhiều khí độc như CO<sub>2</sub> và H<sub>2</sub>S (Graham, 1997). Mang lươn đồng bị tiêu biến đáng kể và không có hiệu quả cao trong quá trình trao đổi chất, thay vào đó, sự hấp thụ oxy xảy ra chủ yếu trên các biểu mô mạch máu trong khoang miệng và thực quản (Shih, 1940; Rainboth, 1996; Iversen et al., 2013; Damsgaard et al., 2014). Lươn đồng không có cơ quan hô hấp khí trời chuyên biệt như các loài hô hấp khí trời khác, lươn đồng trao đổi khí với môi trường bằng cách sử dụng các biểu mô có rất nhiều mạch máu trên bề mặt da khi môi trường nước thiếu oxy (Taylor, 1831). Trong tự nhiên, mặc dù lươn đồng sống ở môi trường nước tĩnh và ngập trong nước nhưng chỉ số về pH, pCO<sub>2</sub> và pO<sub>2</sub> trong máu lươn đồng vẫn ổn định không thay đổi đã cho thấy quá trình trao đổi khí của chúng có sự kết hợp của da, bề mặt khoang miệng và mang để hỗ trợ bài tiết CO<sub>2</sub> cũng như hấp thụ O<sub>2</sub> (Wu & Liu, 1943; Liem, 1967; Iversen et al., 2013).

Điều hòa acid và base hay điều hòa pH máu của động vật là quá trình quan trọng giúp sinh vật thích nghi với những thay đổi của môi trường sống cũng như những thay đổi ngay bên trong cơ thể. Đặc biệt, ở động vật thủy sinh, khi môi trường sống là nước thì cơ chế điều hòa acid và base càng trở nên cần thiết hơn và cũng bị ảnh hưởng bởi các tác động từ những thay đổi của môi trường sống (Heisler et al., 1976). Trong điều kiện thuận lợi, pH máu cá thường ổn định khoảng 7,5-7,7 (Garey, 1970); khi môi trường sống thay đổi, pH máu biến động thiên về acid hoặc base đều làm cho hoạt tính của hệ thống enzyme trong tế bào bị ảnh hưởng cũng như tính chất lý hóa học của các chất trong tế bào cũng bị thay đổi gây ảnh hưởng đến chức năng bình thường của cơ thể một cách rõ rệt (Heisler, 1980). Những năm gần đây, biến đổi khí hậu, hiệu ứng nhà kính đã làm hàm lượng CO<sub>2</sub> trong không khí tăng cao đáng kể cũng gây ra nhiều ảnh hưởng tiêu cực đến đời sống động vật thủy sinh cũng như nuôi trồng thủy sản. Theo Boyd (1998), khi hàm lượng CO<sub>2</sub> trong ao nuôi tăng cao gây nhiều tác hại đến đời sống động vật thủy sinh. Áp suất riêng phần của CO<sub>2</sub> trong nước (PwCO<sub>2</sub>) lớn hơn PCO<sub>2</sub> trong máu cá sẽ kiềm hãm quá trình thải CO<sub>2</sub> qua mang, làm tăng CO<sub>2</sub> trong máu từ đó làm giảm khả năng hô hấp của cá và dẫn đến sự thay đổi mạnh các phản ứng sinh lý của cơ thể cá (Truchot, 1987). Một số nghiên cứu về

ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đối với loài thủy sản có cơ quan hô hấp phụ như nghiên cứu của Damsgaard et al. (2015), Gam et al. (2018) trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá thát lát (*Chitala ornata*) về ảnh hưởng của CO<sub>2</sub> đối với việc điều chỉnh acid và base đã cho thấy 2 loài này có khả năng điều hòa acid và base cao hơn so với các loài hô hấp khí trời khác.

Bên cạnh, sự gia tăng áp suất CO<sub>2</sub> trong nước thì sự tồn tại của nitrite trong ao nuôi thủy sản cũng là vấn đề đáng lo ngại đối với các loài động vật thủy sinh (Lewis & Morris, 1986). Thông thường nồng độ nitrite trong nước khoảng dưới 1 μM (Jensen, 2003), nhưng sự sinh ra quá mức của các sản phẩm nitơ, các chất thải hữu cơ hay sinh khối cao có thể làm tăng nồng độ nitrite trong hệ thống nuôi trồng thủy sản và thủy vực tự nhiên (Eddy & Williams, 1987; Hargreaves, 1998; Jensen, 2003). Hiện nay, các nghiên cứu về tác động của nitrite trong môi trường lên các đặc điểm sinh học cũng như khả năng điều hòa acid và base của các loài cá hô hấp khí trời vùng nhiệt đới vẫn còn rất ít. Cho đến nay, chỉ có vài nghiên cứu trên các loài cá có cơ quan hô hấp khí trời như cá tra (*P. hypophthalmus*), cá lóc (*Channa striata*) của Lefevre et al. (2011 và 2012) và cá thát lát (*C.ornata*) của Gam et al. (2017) đã ghi nhận được các kết quả tiêu biểu về khả năng chịu đựng nitrite cao trong việc giảm hấp thụ nitrite thông qua mang và các cơ chế khử nitơ hiệu quả. Theo Jensen (2003), nitrite không chỉ làm giảm oxy trong máu do metHb hình thành mà còn ảnh hưởng đến các cơ quan khác qua nhiều cơ chế khác nhau. Tiếp xúc nitrite làm nhịp tim tăng nhanh trên cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*). Nitrite cũng làm tăng sự trao đổi khí qua mang từ sự tăng PO<sub>2</sub> (và giảm PCO<sub>2</sub>) trên cá chép (Jensen et al., 1987; Aggergaard & Jensen, 2001).

Những nghiên cứu về phản ứng sinh lý của lươn đồng với các điều kiện môi trường thay đổi vẫn còn rất ít, đặc biệt là nghiên cứu điều hòa acid và base trong máu trước sự ảnh hưởng của CO<sub>2</sub> và nitrite trong nước cao đến các loài cá nhiệt đới vẫn rất hạn chế. Ở môi trường sống đặc thù trong các đầm lầy, thiếu oxy và độc chất cao, cơ chế điều hòa acid và base trong máu của lươn đồng sẽ hoạt động như thế nào trước ảnh hưởng của các yếu tố môi trường? Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm giải đáp câu hỏi về ảnh hưởng của CO<sub>2</sub> và nitrite lên khả năng điều hòa acid base của lươn đồng.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

Nghiên cứu đã được thực hiện tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2. Hệ thống thí nghiệm

Hệ thống trộn khí CO<sub>2</sub> của máy điều chỉnh Wösthoff, (Bochum, Germany) được sử dụng trong tự như các nghiên cứu của Thịnh et al. (2019) và Gam et al. (2018) để điều chỉnh đúng hàm lượng CO<sub>2</sub> thí nghiệm. Muối NaNO<sub>2</sub> được sử dụng để bổ sung nitrite vào các nghiệm thức. Nồng độ nitrite được pha từ muối NaNO<sub>2</sub> được tính toán theo phương pháp sau:



$$69 \text{ (g)} \rightarrow 46 \text{ (g)}$$

$$Y \text{ (g)} \leftarrow X \text{ (g)}$$

$$\rightarrow Y \text{ (g)} = \frac{X \text{ (g)} \times 69 \text{ (g)}}{46 \text{ (g)}}$$

Trong đó: X là nồng độ nitrite của các nghiệm thức và Y là lượng NaNO<sub>2</sub> cần bổ sung vào nước để đạt đúng nồng độ nitrite thí nghiệm. Nồng độ nitrite trong mỗi bể được đo mỗi ngày theo phương pháp của Lefevre et al. (2011) và Miranda et al. (2001).

Nước máy đã khử chlorine được sử dụng cho toàn bộ các thí nghiệm của nghiên cứu. Trong suốt thí nghiệm, chất lượng nước luôn được kiểm tra 2 lần/ngày vào 8 giờ và 17 giờ gồm các chỉ tiêu nhiệt độ pH, oxy hòa tan, CO<sub>2</sub> hòa tan, tổng nồng độ ammonia (TAN) và nitrite. Các chỉ tiêu này luôn được duy trì ổn định trong suốt thời gian thí nghiệm. Nhiệt độ nước trung bình 27-29°C, pH nước dao động: 7,7-7,8; oxy hòa tan 90%, riêng đối với nghiệm thức đối chứng thì hàm lượng CO<sub>2</sub> hòa tan < 0,4% và TAN < 0,05M

### 2.3. Đối tượng thí nghiệm

Lươn đồng (có kích cỡ 250-350 g/con) được chọn mua từ các trại nuôi tại huyện Vĩnh Thạnh, thành phố Cần Thơ và được chuyển về phòng thí nghiệm của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Lươn đồng được trữ trong các bể composite có sục khí, thay nước hàng ngày trong 3 đến 4 tuần trước khi thí nghiệm và lươn đồng được cho ăn cá tạp 2 lần/ngày theo nhu cầu. Lươn đồng được ngừng cho ăn 3 ngày trước khi bắt đầu bố trí thí nghiệm.

### 2.4. Phương pháp đút ống thông mạch máu

Lươn đồng được gây mê trong nước bằng thuốc mê benzocaine (Merck, Germany) với nồng độ 225 mg/L trong 20 phút trước khi tiến hành phẫu thuật.

Quá trình phẫu thuật được tiến hành trong điều kiện vô trùng. Phương pháp đút ống của Heisler 1982 trên cá chình được sử dụng để đặt ống cho lươn đồng. Dao phẫu thuật được dùng để rạch 1 đường nhỏ trên bụng lươn đồng (chiều dài vết mổ khoảng 3 cm); tiến hành mở bụng lươn đồng và xác định động mạch cần tim; cố định động mạch bằng chỉ phẫu thuật (silk 3-0), dùng kéo cắt nhẹ trên thành động mạch 1 lỗ nhỏ, nhanh tay đưa ống dẫn lưu (PE 40) đã chứa dung dịch heparin vào động mạch thông qua lỗ nhỏ vừa tạo; kiểm tra máu có thể chảy đều trong ống dẫn lưu, cố định ống dẫn lưu và cột chặt với động mạch lươn đồng tránh gây chảy máu. Cuối cùng, đóng bụng lươn đồng và cố định ống dẫn lưu bằng các vết khâu theo dọc chiều dài của lươn đồng. Lươn đồng sau khi đặt ống được đưa vào các bể chứa nước sạch có sục khí để phục hồi trong vòng 24 giờ trước khi bắt đầu thí nghiệm.

Mục đích của việc sử dụng lươn đồng đặt ống thông mạch máu trong thí nghiệm này nhằm theo dõi chính xác sự thay đổi sinh lý của cá thể lươn đồng từ khi bắt đầu đến kết thúc thí nghiệm tiếp xúc với môi trường bất lợi so với phương pháp lấy máu truyền thống (lấy từ đuôi, mỗi lần lấy mẫu là các lươn đồng khác nhau). Từ đó, nghiên cứu sẽ có được các kết quả thuyết phục hơn về các tác động của CO<sub>2</sub> và nitrite lên khả năng điều hòa acid và base của lươn đồng.

### 2.5. Bố trí thí nghiệm

Lươn đồng đã phục hồi sau đút ống lưu dẫn động mạch được dùng trong thí nghiệm. Nồng độ nitrite sử dụng trong nghiên cứu là giá trị LC<sub>5</sub> 96 giờ = 23,57 mM của lươn đồng theo Huong et al. (2014). Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 6 lần tương ứng với 6 con lươn đồng. Các nghiệm thức gồm:

Nghiệm thức 1: 0 mmHg CO<sub>2</sub>+0 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (đối chứng)

Nghiệm thức 2: 30 mmHg CO<sub>2</sub>

Nghiệm thức 3: 23,57 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Nghiệm thức 4: 30 mmHg CO<sub>2</sub>+23,57 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Máu lươn đồng được lấy thông qua ống dẫn lưu động mạch tại các thời điểm thu mẫu 0, 24, 48, 72 và 96 giờ, mỗi lần sẽ lấy 0,7-1 mL máu/con lươn đồng. Máu được chia làm 2 phần, một phần máu được sử dụng để đo các chỉ tiêu pH, PaCO<sub>2</sub>, metHemoglobin (metHb), hemoglobin (Hb) và hematocrit (Hct), phần còn lại được ly tâm 6.000 vòng/phút trong 6 phút ở 4°C để tách lấy huyết tương. Huyết tương được trữ trong điều kiện -80°C

và sau đó được phân tích các chỉ tiêu  $\text{HCO}_3^-$ , ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  và áp suất thẩm thấu.

## 2.6. Phương pháp phân tích mẫu

Các chỉ tiêu về môi trường như nhiệt độ và pH nước được đo bằng máy đo cầm tay Mettler-Toledo (AG 8603 Schwerzenbach, Thụy Sĩ), oxy hòa tan được đo bằng máy cầm tay YSI 556 (YSI, Ohio, USA) và  $\text{CO}_2$  được đo bằng máy đo Oxyguard Pacific (Oxyguard International A/S, Farum, Đan Mạch).

Giá trị pH và  $\text{PaCO}_2$  trong máu được đo trực tiếp bằng máy đo khí máu cầm tay iStat (Abbott) và được tính đền bù nhiệt độ theo Matle et al. (2014) (i-STAT Corporation, Princeton, USA) (Harter et al., 2014; Damgaard et al., 2015). Hàm lượng  $\text{HCO}_3^-$  trong huyết tương được tính từ giá trị tổng  $\text{CO}_2$  theo phương pháp Cameron (1971) và dựa vào công thức của Henderson-Haselbach với giá trị  $\alpha\text{CO}_2$  theo Boutilier et al. (1985) như sau:

$$\alpha\text{CO}_2 = 1,0064 \times 10^{-1} - 5,4431 \times 10^{-3}(T) + 2,1776 \times 10^{-4} \times (T^2) - 4,9731 \times 10^{-6} \times (T^3) + 4,5288 \times 10^{-8} (T^4)$$

T là nhiệt độ môi trường nuôi.

Hàm lượng haemoglobin được đo bằng thuốc thử Drabkin ở bước sóng 540 nm và tỷ lệ huyết sắc tố được đo theo Larsen and Snieszko (1961). Hàm lượng ion  $\text{Na}^+$  và  $\text{K}^+$  trong huyết tương được đo bằng máy Flame Photometer 420.

Giá trị MethHb trong máu lươn đồng được xác định bằng dung dịch phosphate buffer 0,02 M có pH 7,3 theo Lefevre et al. (2011): cho 10  $\mu\text{L}$  máu vào 1 mL dung dịch buffer pH 7,3 và ly tâm 18.000 vòng trong 5 phút, lấy phần dung dịch nổi so màu quang phổ với phần mềm Scan 480-700 nm. Dựa vào đường chuẩn, tỷ lệ metHb được tính bằng phần mềm SigmaPlot 12.5.

## 2.7. Xử lý số liệu

Các giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và sai số chuẩn được tính bằng phần mềm Excel 2013. Phân tích sai khác giữa các nghiệm thức trong cùng một thời điểm thu mẫu và giữa các giờ thu mẫu trong cùng một nghiệm thức được sử dụng phần mềm SPSS.18 với phép phân tích ANOVA 1 nhân tố ở mức ý nghĩa 95%. Các hình được vẽ bằng phần mềm SigmaPlot.

## 3. KẾT QUẢ

Nhiệt độ nước bể nuôi lươn đồng dao động từ 27,3°C đến 28,7°C và nồng độ oxy hòa tan từ 6,15 đến 6,37 mg/L ở tất cả các nghiệm thức. pH nước

dao động trong khoảng 6,72 đến 7,25 ở các nghiệm thức không kiểm soát  $\text{CO}_2$  và pH nước các nghiệm thức có kiểm soát  $\text{CO}_2$  là 6,29±0,05. Theo Boyd and Tucker (1998), các yếu tố môi trường bề thí nghiệm nằm trong khoảng thích hợp cho sự phát triển bình thường của động vật thủy sản nên không ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm.

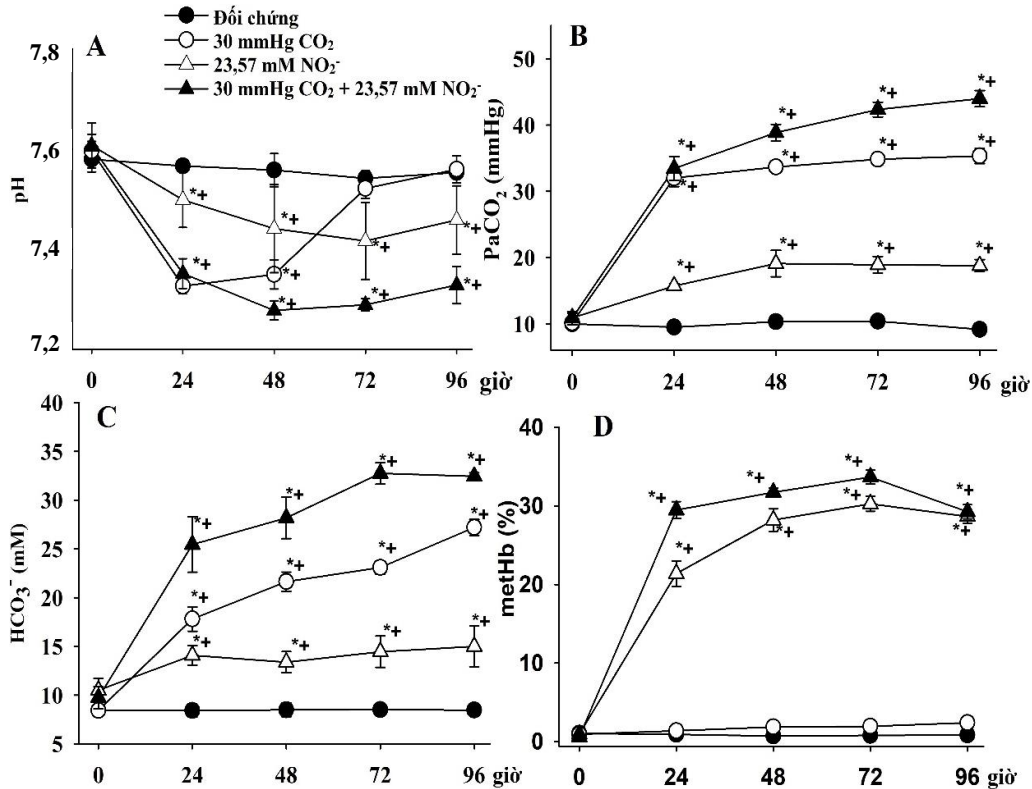
Khả năng điều hòa acid và base của lươn đồng được thể hiện qua sự điều hòa pH cũng như sự thay đổi  $\text{PaCO}_2$  và  $[\text{HCO}_3^-]$  trong máu lươn đồng sau 96 giờ thí nghiệm (Hình 1). Ở nghiệm thức 30 mmHg  $\text{CO}_2$  thì pH lươn đồng bắt đầu phục hồi sau 24 giờ thí nghiệm và phục hồi hoàn toàn sau 96 giờ. Nghiệm thức 23,57 mM  $\text{NO}_2^-$ , giá trị pH giảm thấp nhất ở thời điểm 72 giờ là 7,41 và khác có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 30 mmHg  $\text{CO}_2$  ( $p < 0,05$ ). Sau 96 giờ, pH máu lươn đồng ở nghiệm thức 23,57 mM  $\text{NO}_2^-$  chỉ phục hồi về giá trị 7,42. Bên cạnh, pH máu của lươn đồng ở nghiệm thức kết hợp  $\text{CO}_2$  và nitrite lại có giá trị thấp nhất sau 48 giờ là 7,27, khác so với đối chứng ( $p < 0,05$ ); sự tác động kết hợp của  $\text{CO}_2$  cao và nitrite làm khả năng phục hồi pH của lươn đồng chỉ đạt 96%, vẫn thấp hơn nghiệm thức 23,57 mM  $\text{NO}_2^-$ . Song song với pH là áp suất riêng phần  $\text{CO}_2$  trong máu lươn đồng,  $\text{PaCO}_2$  trong máu đạt cao nhất ở nghiệm thức kết hợp  $\text{CO}_2$  và nitrite là 43,9 mmHg sau 96 giờ, cao gấp 1,6 lần so với nghiệm thức 30 mmHg  $\text{CO}_2$  và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng và nghiệm thức 23,57 mM  $\text{NO}_2^-$  ( $p < 0,05$ ).  $\text{PaCO}_2$  ở nghiệm thức nitrite đơn chỉ tăng cao nhất đến 19 mmHg sau 48 giờ và giảm dần sau 96 giờ.

Nồng độ  $\text{HCO}_3^-$  cao nhất ở nghiệm thức kết hợp  $\text{CO}_2$  và nitrite là 32,4 mM sau 96 giờ ( $p < 0,05$ ). Ở nghiệm thức 23,57 mM  $\text{NO}_2^-$ , nồng độ  $\text{HCO}_3^-$  trong máu lươn đồng cũng tăng cao khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng sau 96 giờ tiếp xúc nitrite là 15 mM ( $p < 0,05$ ) dù nghiệm thức hàm lượng  $\text{CO}_2$  là rất thấp ( $< 0,04$ ) so với hai nghiệm thức có bổ sung  $\text{CO}_2$ . Sự gia tăng metHb trong máu lươn đồng cho thấy có sự xâm nhập nitrite vào máu lươn đồng. Kết quả thí nghiệm cho thấy sau 24 giờ tiếp xúc với nitrite thì tỷ lệ metHb của các nghiệm thức có nitrite tăng rất cao, đến 29% và 33% lần lượt ở nghiệm thức 23,57 mM  $\text{NO}_2^-$  và nghiệm thức 30 mmHg  $\text{CO}_2$ +23,57 mM  $\text{NO}_2^-$  và khác biệt có ý nghĩa so với 0 giờ cũng như so với đối chứng ( $p < 0,05$ ).

Ngoài ảnh hưởng lên giá trị pH máu, tỷ lệ metHb thì nitrite cao còn ảnh hưởng đến quá trình sự điều hòa các ion trong máu được thể hiện qua sự cạnh tranh giữa các kênh ion với nhau. Sự thay đổi một số ion phổ biến trong máu lươn đồng được thể hiện

trong Hình 2. Nitrite xâm nhập vào máu dẫn đến nồng độ các ion  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$  giảm đáng kể ở cả hai nghiệm thức  $23,57 \text{ mM NO}_2^-$  và nghiệm thức  $30 \text{ mmHg CO}_2 + 23,57 \text{ mM NO}_2^-$ . Nồng độ ion  $\text{Na}^+$  giảm mạnh nhất ở thời điểm 96 giờ ở cả hai nghiệm thức nói trên, lần lượt là  $96,3 \text{ mM}$  và  $90 \text{ mM}$ , khác

biệt có ý nghĩa so với đối chứng ( $p < 0,05$ ). Tương tự, với  $\text{Na}^+$  thì nồng độ ion  $\text{Cl}^-$  cũng giảm mạnh còn  $85 \text{ mM}$  và  $83 \text{ mM}$  cho hai nghiệm thức  $23,57 \text{ mM NO}_2^-$  và nghiệm thức  $30 \text{ mmHg CO}_2 + 23,57 \text{ mM NO}_2^-$ .



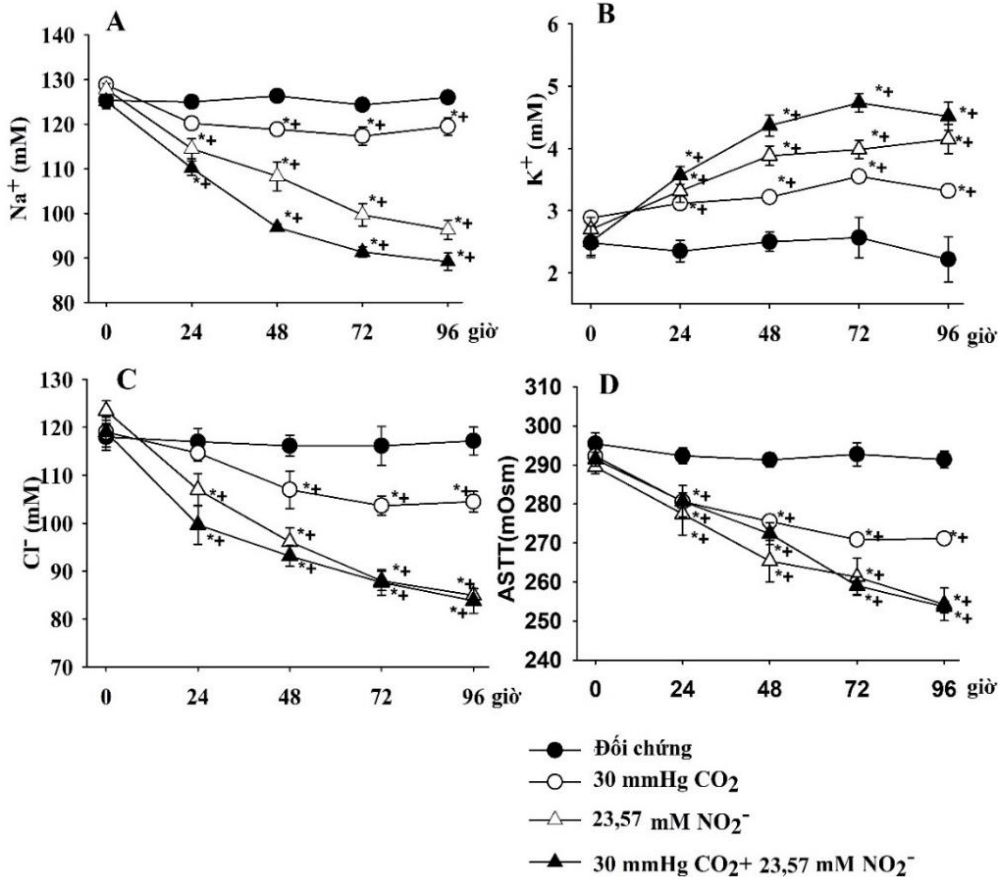
**Hình 1. Giá trị pH (A), áp suất riêng phần CO<sub>2</sub> (mmHg) (B), nồng độ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mM) (C) và tỷ lệ methb (%) (D) trong động mạch lươn.**

Dấu (\*) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với 0 giờ trong cùng nghiệm thức ( $p < 0,05$ ) và (+) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức trong một thời điểm nhất định ( $p < 0,05$ ).

Ngược với  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$ , nồng độ ion  $\text{K}^+$  lại tăng mạnh khi lươn đồng tiếp xúc môi trường bất lợi. Nồng độ ion  $\text{K}^+$  tăng cao nhất ở thời điểm 72 giờ ở nghiệm thức  $30 \text{ mmHg CO}_2 + 23,57 \text{ mM NO}_2^-$  là  $4,7 \text{ mM}$ . Mặc dù ion  $\text{K}^+$  tăng mạnh nhưng sự giảm ion  $\text{Na}^+$  và  $\text{Cl}^-$  cũng sẽ làm giảm áp suất thẩm thấu trong máu lươn đồng. Kết quả sau 96 giờ thí nghiệm cho thấy áp suất thẩm thấu của lươn đồng ở hai nghiệm thức  $23,57 \text{ mM NO}_2^-$  và nghiệm thức  $30 \text{ mmHg CO}_2 + 23,57 \text{ mM NO}_2^-$  giảm thấp chỉ còn  $254$  và  $253 \text{ mOsm}$ , khác biệt có ý nghĩa so với 0 giờ và nghiệm thức đối chứng.

Nồng độ Hb và tỷ lệ Hct được thể hiện trong Bảng 1 cho thấy không thay đổi nhiều sau 96 giờ

tiếp xúc với hai loại độc chất là  $\text{CO}_2$  và nitrite, nồng độ Hb của lươn đồng chỉ dao động trong khoảng từ  $9 \text{ mM}$  đến  $10 \text{ mM}$  và tỷ lệ Hct cũng tăng nhẹ từ  $50\%$  thời điểm 0 giờ lên  $51,5\%$ . Nồng độ Hb tổng của lươn đồng tăng cao nhất ở hai nghiệm thức có nitrite là nghiệm thức  $23,57 \text{ mM NO}_2^-$  và nghiệm thức  $30 \text{ mmHg CO}_2 + 23,57 \text{ mM NO}_2^-$  lần lượt là  $10,3$  và  $10,2 \text{ mM}$ . Sự gia tăng nồng độ này khác biệt có ý nghĩa so với thời điểm 0 giờ của thí nghiệm ( $p < 0,05$ ). Vì nồng độ Hb tăng không đáng kể nên tỷ lệ huyết sắc tố của lươn đồng cũng tăng nhẹ và tăng nhiều nhất cũng ở hai nghiệm thức có nitrite và nghiệm thức kết hợp  $\text{CO}_2$  và nitrite.



**Hình 2. Nồng độ các loại ion Na<sup>+</sup> (mM) (A), K<sup>+</sup> (mM) (B), Cl<sup>-</sup> (mM) (C) và áp suất thẩm thấu (mOsm) (D) trong huyết tương của lươn đồng.**

Dấu (\*) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với 0 giờ trong cùng nghiệm thức ( $p < 0,05$ ) và (+) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức trong một thời điểm nhất định ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 1. Nồng độ Hemoglobin (Hb) (mM) và tỷ lệ huyết sắc tố (Hct) (%) trong động mạch của lươn đồng được đút ống sau 96 giờ thí nghiệm**

| Hb (mM)   | 0 giờ       | 24 giờ     | 48 giờ     | 72 giờ      | 96 giờ      |
|---|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Đối chứng   | 9,6 ± 0,6   | 9,7 ± 0,7  | 9,5 ± 0,5  | 9,4 ± 0,3   | 9,4 ± 0,4   |
| 30 mmHg CO <sub>2</sub>   | 9,2 ± 0,3   | 9,3 ± 0,2  | 9,6 ± 0,4  | 9,6 ± 0,4   | 9,5 ± 1,3   |
| 23,57 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>                           | 9,1 ± 0,5   | 9,21 ± 1   | 9,3 ± 1,1  | 9,5 ± 0,9   | 10,3 ± 0,5  |
| 30 mmHg CO <sub>2</sub> + 23,57 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 8,7 ± 0,2   | 8,9 ± 0,1  | 9,7 ± 0,4  | 9,8 ± 0,2   | 10,2 ± 0,4* |
| Hct (%)   |             |            |            |             |             |
| Đối chứng   | 50,8 ± 0,8  | 51,5 ± 1,1 | 50,2 ± 1,6 | 49 ± 1,3    | 50,8 ± 1,2  |
| 30 mmHg CO <sub>2</sub>   | 49,7 ± 1,35 | 50,1 ± 1,6 | 50 ± 1,4   | 51,2 ± 1,3  | 51,8 ± 1,1  |
| 23,57 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>                           | 50,0 ± 1,1  | 50,3 ± 1,4 | 50,7 ± 1,2 | 51,4 ± 1,37 | 51,5 ± 1,2  |
| 30 mmHg CO <sub>2</sub> + 23,57 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 49,4 ± 0,5  | 49,4 ± 1,1 | 50,3 ± 0,7 | 50,2 ± 1,2  | 50,5 ± 0,6  |

Dấu (\*) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với 0 giờ trong cùng nghiệm thức ( $p < 0,05$ ) và (+) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức trong một thời điểm nhất định ( $p < 0,05$ ).

#### 4. THẢO LUẬN

Sự mất cân bằng trong quá trình nitrate hóa và khử nitrate hóa của vi khuẩn trong ao nuôi là một

nguyên nhân làm tăng cao hàm lượng nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) trong môi trường nước tĩnh có hàm lượng chất hữu cơ cao (Eddy & Williams, 1987; Jensen, 1995). Nitrite trong môi trường sẽ đi vào huyết tương của

cá nước ngọt thông qua mang, ở đó nitrite sẽ cạnh tranh với ion Cl<sup>-</sup> để hấp thụ clor hoạt động thông qua kênh trao đổi HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> (Williams & Eddy, 1986; Jensen, 2003). Sau đó nitrite sẽ xâm nhập vào các tế bào hồng cầu bằng cách khuếch tán thông qua sự khuếch tán các anion hóa trị I và khuếch tán HNO<sub>2</sub> cho đến khi đạt được trạng thái cân bằng xuyên màng (Jensen & Rohde, 2010). Khả năng phục hồi pH của lươn đồng khi bị hô hấp acid gây ra do môi trường sống tăng tính acid từ việc áp suất riêng phần CO<sub>2</sub> tăng lên đến 30 mmHg (tương đương khoảng 4%) đã được thể hiện trong nghiệm thức đơn CO<sub>2</sub> cho thấy pH lươn đồng hoàn toàn hồi phục sau 72 giờ tiếp xúc với CO<sub>2</sub> cao và nồng độ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> trong huyết tương của lươn đồng tăng cao. Theo Thinh et al. (2019), ở mức CO<sub>2</sub> cao (30 mmHg) thì lươn đồng hoàn toàn có khả năng điều hòa pH máu về trạng thái cân bằng. Khi lươn đồng chịu tác động của cả CO<sub>2</sub> và nitrite cao làm PaCO<sub>2</sub> tăng cao được giải thích do sự xâm nhập của cả 2 độc chất làm lươn đồng bị thiếu oxy cục bộ trong thời gian ngắn dẫn đến sự hô hấp yếm khí tại các tế bào. Kết quả cuối cùng của quá trình hô hấp yếm khí là acid lactic, đây cũng chính là một nguyên nhân làm pH giảm mạnh. Ngoài ra, áp suất riêng phần CO<sub>2</sub> trong nước cao làm cho lươn đồng không đào thải CO<sub>2</sub> ra môi trường được và là nguyên nhân đáng kể làm giá trị PCO<sub>2</sub> trong máu lươn đồng tăng cao. Nhằm phục hồi pH về giá trị cân bằng cũng như đào thải CO<sub>2</sub> trong máu ra môi trường, hệ đệm HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> đã tham gia điều tiết làm tăng nồng độ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> trong máu lươn đồng lên cao (Shartau & Brauner, 2014). Khi kết hợp giữa CO<sub>2</sub> cao và nitrite cao đã làm cho nồng độ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tăng 25,4 mM sau 24 giờ tiếp xúc. Tương ứng với khoảng thời gian đó thì nồng độ ion Cl<sup>-</sup> và Na<sup>+</sup> lại giảm mạnh chỉ sau 24 giờ. Do đó, gần như trao đổi H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> đóng một vai trò quan trọng trong sự tích lũy của HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> trong thời gian ảnh hưởng ban đầu. Quá trình điều hòa acid và base cấp tính trên lươn đồng đã được điều hòa qua các kênh trao đổi ion là H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> và HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>. Tuy nhiên, khả năng đền bù pH của lươn đồng ở nghiệm thức kết hợp CO<sub>2</sub> và nitrite thì chậm hơn so nghiệm thức đơn với nitrite hoặc CO<sub>2</sub>. Sự trao đổi HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> là cơ chế chủ yếu cho sự tích tụ acid ở cá nước ngọt được ghi nhận bởi Wood (1991), Goss et al. (1992b) và Perry et al. (2003).

Sự tiếp xúc kết hợp của nitrite và CO<sub>2</sub> trên cá tra (*P. hypophthalmus*) cũng cho kết quả cùng xu hướng với lươn đồng, hàm lượng metHb của cá tra đã tăng đột ngột đến 15% và pH giảm mạnh 0,1 đơn vị trong 24 giờ đầu tiếp xúc ở nghiệm thức đơn với nitrite (Hvas et al., 2016). Điều này tương tự khi cá chép (*Cyprinus carpio*) và cá mút đá Đại Tây Dương

(Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*) tiếp xúc với nitrite làm giảm pH ngoại bào bởi sự tăng lượng nitrite tích lũy trong máu (Jensen & Rohde, 2010). Tuy nhiên, lại có những phản ứng tương phản trên tôm nước ngọt (*Astacus astacus*) (Jensen et al., 2000) và trên cá thát lát còm (*C. ornata*) (Gam et al., 2018). Mặc dù lươn đồng có khả năng điều hòa acid và base hoàn toàn sau 72 giờ trong môi trường 30 mmHg CO<sub>2</sub>, nhưng quá trình cân bằng acid và base của lươn đồng lại thấp hơn so với cá thát lát còm trong suốt quá trình tiếp xúc kết hợp nitrite và CO<sub>2</sub> (Gam et al., 2018).

Nồng độ ion Na<sup>+</sup> trong huyết tương giảm khi lươn đồng tiếp xúc với nitrite cũng tương tự các kết quả nghiên cứu của Jensen (1996) trên tôm nước ngọt và của Stormer et al. (1996) trên cá hồi (*O. mykiss*) cũng như tương tự như kết quả nghiên cứu trên cá thát lát còm của Gam et al. (2017). Bên cạnh, nitrite cũng ảnh hưởng đến thay đổi nồng độ K<sup>+</sup> trong huyết tương. Sự tiếp xúc nitrite làm nồng độ K<sup>+</sup> tăng lên đáng kể trên cá bơn (Grosell & Jensen, 2000) và cá tầm (Huertas et al., 2002) và cá thát lát còm (Gam et al., 2017). Sự gia tăng nồng độ K<sup>+</sup> đã gây trở ngại cho hoạt động của tim và các mô sẽ ảnh hưởng đến trao đổi chất và chức năng của cơ. Sự gia tăng nồng độ K<sup>+</sup> đã gây ảnh hưởng đến chức năng tim mạch ở động vật thủy sản như làm dẫn mạch máu và giảm áp suất máu ở động mạch (Vleeming et al., 1997). Theo Aggergaard and Jensen (2001), nitric oxide (NO) được hình thành từ nitrite là nguyên nhân dẫn đến việc giãn tĩnh mạch. Cũng trên cá hồi vân, nhịp tim cá giảm khi tiếp xúc nitrite sẽ gây ảnh hưởng nghiêm trọng lên các chức năng sinh lý (Aggergaard & Jensen, 2001).

Hầu hết các loài hô hấp khí trời, khi CO<sub>2</sub> trong môi trường cao sẽ chuyển từ trao đổi khí qua mang sang hô hấp khí trời (Bojink et al., 2010). Tuy nhiên, vẫn chưa có bằng chứng nào về sự giảm trao đổi khí qua mang và giảm tốc độ trao đổi chất để giảm sự hấp thụ nitrite như hoạt động hô hấp khí trời (Lefevre et al., 2016). Ngoài ra, kết quả nghiên cứu trên cá ngựa vằn (*Danio rerio*) (Jensen, 2007) và cá tra (*P. hypophthalmus*) (Lefevre et al., 2011) cũng cho thấy sự sinh ra metHb khi tiếp xúc nitrite không làm thay đổi tốc độ trao đổi chất. Bên cạnh, áp suất thẩm thấu của các loài cá hô hấp khí trời thường không thay đổi trong suốt quá trình tiếp xúc với nitrite (Jensen et al., 1987; Stormer et al., 1996). Trong thí nghiệm này, lươn đồng đã có sự giảm sút đáng kể của áp suất thẩm thấu trong huyết tương ở nghiệm thức CO<sub>2</sub> đơn và nghiệm thức kết hợp nitrite và CO<sub>2</sub> cho đến cuối thí nghiệm. Kết quả này tương tự với một số thí nghiệm trước đây trên cá lóc (*C.*



*striata*) (Lefevre et al., 2012), cá thát lát (*C. ornata*) giống (Gam et al., 2017) và cá thát lát thương phẩm (*C. ornata*) (Gam et al., 2018a), nơi mà sự giảm nhanh chóng của áp suất thẩm thấu đã dẫn đến dịch cơ thể cá bị loãng bởi sự tăng thể tích nước hấp thụ suốt quá trình tiếp xúc nitrite (Jensen et al., 1987; Jensen, 1990, 1996; Harris and Coley, 1991; Grosell & Jensen, 2000; Gam et al., 2017), làm ngăn chặn sự hấp thụ các ion chủ động qua mang và có thể trong thận, làm mất cân bằng điện - nước dẫn đến làm giảm đáng kể các ions Cl<sup>-</sup> và Na<sup>+</sup> (Jensen, 1990; và Gam et al., 2017). Một khả năng khác giải thích cho điều này là từ sự giảm áp suất thẩm thấu kéo theo sự tăng tần suất hô hấp khí trời do nitrite tạo ra sự hô hấp acid (Shartau & Brauner, 2014). Kết quả tương tự với thí nghiệm trên cá tra (*P. hypophthalmus*) (Hvas et al., 2016), nghiên cứu này

không xuất hiện tỉ lệ chết khi tiếp xúc kết hợp nitrite và CO<sub>2</sub> trên lươn đồng.

## 5. KẾT LUẬN

Lươn đồng có khả năng điều hòa ion khi bị nitrite xâm nhập vào máu mặc dù diện tích bề mặt mang giảm đáng kể so với các loài cá khác. Tuy nhiên, sự xâm nhập nitrite gây cản trở quá trình phục hồi pH của lươn khi lươn sống trong điều kiện CO<sub>2</sub> và nitrite cao.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện tại khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ và được tài trợ bởi Dự án iAQUA và tổ chức DANIDA (Đan Mạch) [DFC số 12-014AU]. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đặc biệt đến PGS.TS. Mark Bayley và GS.TS. Tobias Wang đã cho các nhận xét và đóng góp rất có giá trị.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aggergaard, S. & Jensen, F. B. (2001). Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 59(1), 13–27. <https://doi.org/10.1111/j.1095.8649.2001.tb02335.x>
- Boijink, C., Florindo, L. H., Leite, C. A. C., Kalinin, A. L., Milsom, W. K. & Rantin, F.T. (2010). Hypercarbic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): The role of branchial CO<sub>2</sub> chemoreceptors. *Journal of Experimental Biology*, 213, 2797-2807. <http://doi.org/10.1242/jeb.040733>
- Boutilier, R. G., Iwama, G. K., Heming, T. A. & Randall, D. J. (1985). The apparent pK of carbonic acid in rainbow trout blood plasma between 5 and 15°C. *Respiration Physiology*, 61, 237-254. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(85\)90129-X](https://doi.org/10.1016/0034-5687(85)90129-X)
- Boyd, C. E. (1998). *Water quality in pond for Aquaculture. Research and Development Series* No. 43 August 1998. International center for aquaculture and aquatic environment, Alabama agriculture experiment station, Auburn University, Auburn, Alabama, 37 pages.
- Cameron, J. N. (1971). Rapid method for determination of total carbon dioxide in small blood samples. *Journal of Applied Physiology*, 31, 632–634. DOI: 10.1152/jappl.1971.31.4.632
- Damsgaard, C., Findorf, I., Helbo S., Kocagoz, Y., Buchanan, R., Huong, D. T. T., Weber, R. E., Fago A., Bayley, M. & Wang, T. (2014). Very high blood oxygen in the air-breathing swamp eel *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 178, 102-108. DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.08.001.
- Damsgaard, C., Gam, L. T. H., Tuong, D. D., Thinh, P. V., Huong, D. T. T., Wang, T. & Bayley, M. (2015). High capacity for extracellular acid–base regulation in the air-breathing fish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Journal of Experimental Biology*, 218, 1290-1294. DOI: 10.1242/jeb.117671.
- Eddy, F. B. & Williams, E. M. (1987). Nitrite and Freshwater Fish. *Chemical Ecology*, 3(1), 1-38. DOI:10.1080/02757548708070832.
- Gam, L. T. H., Jensen, F. B., Damsgaard, C., Huong, D. T. T., Phuong, N. T. & Bayley, M. (2017). Extreme nitrite tolerance in the clown knifefish *Chitala ornata* is linked to up-regulation of methaemoglobin reductase activity. *Aquatic Toxicology*, 187, 9–17. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.03.013.
- Gam, L. T. H., Jensen, F. B., Huong, D. T. T., Phuong, N. T. & Bayley, M. (2018). The effects of elevated environmental CO<sub>2</sub> on nitrite uptake in the air-breathing clown knifefish, *Chitala ornata*. *Aquatic Toxicology*, 196, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.011>
- Garey, W. F. (1970). Cardiac output of the carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 33, 181-89. DOI: 10.1016/0010-406x(70)90493-7.
- Goss, G. G., Laurent, P. & Perry, S. F. (1992). Evidence for a morphological component in acid-base regulation during environmental hypercapnia in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Cell Tissue Respiration*, 268, 539–552. <https://doi.org/10.1007/BF00319161>.



- Graham, J. B. (1997). *Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation*. Academic press, San Diego, CA, USA. DOI:10.2307/1447734.
- Grosell, M. & Jensen, F. B. (2000). Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology*, 50, 97–107. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00091-0).
- Hargreaves, J. A. (1998). Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, 166, 181–212. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00298-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00298-1).
- Harris, R. R. & Coley, S. (1991). The effects of nitrite on chloride regulation in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana (Crustacea: Decapoda). *Comparative and Biochemical Physiology*. Part B, 161, 199–206. <https://doi.org/10.1007/BF00262884>.
- Harter, T. S., Shartau, R. B., Brauner, C. J. & Farrell, A.P. (2014). Validation of the i-STAT system for the analysis of blood parameters in fish. *Conservation Physiology*, 2, 1–12. DOI: 10.1093/conphys/cov021.
- Heisler, N., Weitz, H. & Weitz, A. M. (1976). Extra and intracellular pH with changes of temperature in the dogfish *Squalus stellaris*. *Respiration Physiology*, 26, 249-264. DOI: 10.1016/0034-5687(76)90103-1.
- Heisler, N. (1982). Intracellular and extracellular acid-base regulation in the tropical fresh-water teleost fish *Synbranchus marmoratus* in response to the transition from water breathing to air breathing. *Journal of Experimental Biology*, 99, 9-28.
- Heisler, N. (1980). Regulation of the acid-base status in fishes. In M. A., Ali (Ed), *Environmental Physiology of Fishes* (ed.), pp. 123-162. New York: Plenum.
- Huertas, M., Gisbert, E., Rodríguez, A., Cardona, L., Williot, P. & Castello-Orvay, F. (2002). Acute exposure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) yearlings to nitrite: median-lethal concentration (LC<sub>50</sub>) determination, haematological changes and nitrite accumulation in selected tissues. *Aquatic Toxicology*, 57, 257–266. DOI: 10.1016/S0166-445X(01)00207-7.
- Hvas, M., Damsgaard, C., Gam, L.T.H., Huong, D.T.T., Jensen, F.B. & Bayley, M. (2016). The effect of environmental hypercapnia and size on nitrite toxicity in the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquatic Toxicology*, 176, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.020>
- Iversen, N. K., Lauridsen, H., Huong, D. T. T., Van Cong, N., Gesser, H., Buchanan, R., Bayley, M., Pedersen, M. & Wang, T. (2013). Cardiovascular anatomy and cardiac function in the air-breathing swamp eel (*Monopterus albus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 164A, 171–180. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.08.007.
- Jensen, F. B., Andersen, N. A. & Heisler, N. (1987). Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Comparative Physiology*. Part B, 157, 533-541. DOI: 10.1007/BF00700972.
- Jensen, F.B. (1990). Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: Haemolymph and muscle tissue electrolyte status: and haemolymph acid-base balance and gas transport. *Aquatic Toxicology*, 18, 51–60. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90035-N](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90035-N)
- Jensen, F. B. (1995). Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. In P. J. Walsh & P. Wright, (Eds.), *Nitrogen Metabolism and Excretion*. CRC Press, Boca Raton, 289–303.
- Jensen, F. B. (1996). Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish *Astacus astacus*. *Aquatic Toxicology*, 34, 95–104. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00030-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00030-8).
- Jensen, F.B., Koldkjaer, P. & 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*. Part B, 170, 489–495.
- Jensen, F. B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A, 135, 9–24. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00323-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00323-9).
- Jensen, F. B. (2007). Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *Journal of Experimental Biology*. 210, 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748.
- Jensen, F. B. & Rohde, S. (2010). Comparative analysis of nitrite uptake and hemoglobin-nitrite reactions in erythrocytes: sorting out uptake mechanisms and oxygenation dependencies. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, 972–982. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00813.2009>
- Larsen, H. N. & Snieszko, S. F. (1961). Modification of the micro-hematocrit technique with trout blood. *Transaction of the American Fisheries Society*, 90 (2), 139-142.
- Lefevre, S., Jensen, F. B., Huong, D. T. T., Wang, T., Phuong, N. T. & 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, 86–93.  
DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.03.019.
- Lefevre, S., Jensen, F. B., Huong, D. T. T., Wang, T., Phuong, N. T. & Bayley, M. (2012). Haematological and ion regulatory effects of nitrite in the air-breathing snakehead fish *Channa striata*. *Aquatic Toxicology*, 118-119, 48–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.011>.
- Lefevre, S., Findorf, I., Bayley, M., Huong, D. T. T. & Wang, T. (2016). Increased temperature tolerance of the air-breathing Asian swamp eel *Monopterus albus* after high-temperature acclimation is not explained by improved cardiorespiratory performance. *Journal of Fish Biology*, 88 (1), 418-432.  
DOI: 10.1111/jfb.12696.
- Lewis, W. M. & Morris, D. P. (1986). Toxicity of nitrite to fish: A review. *Transaction of American Fisheries Society*, 115(2), 183–195.  
[https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1986\)115<183:TONTF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1986)115<183:TONTF>2.0.CO;2).
- Liem, K. F. (1967). Functional morphology of the integumentary, respiratory, and digestive systems of the synbranchoid fish *Monopterus albus*. *Copeia* 1967, 375–388.
- Malte, C. L., Jakobsen, S. L. & Wang, T. (2014). A critical evaluation of automated blood gas measurements in comparative respiratory physiology. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*, 178, 7-17.  
DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.07.022.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Biology and Chemistry*, 5, 62–71
- Perry, S. F., Shahsavaran, A., Georgalis, T., Bayaa, M., Furimsky, M. & Thomas, S. L. Y. (2003). Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *Journal of Experimental Zoology*, Part A. 300, 53–62.  
<https://doi.org/10.1002/jez.a.10309>.
- Rainboth, W. J. (1996). *Fishes of the Cambodian Mekong*. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Rome: FAO.
- Rosen, D. E. & Greenwood, P. H. (1976). A fourth Neotropical species of synbranchid eel and systematics of synbranchiform fishes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 157, 1-70. <http://hdl.handle.net/2246/620>.
- Shartau, R. B. & Brauner, C. J. (2014). Acid-base and ion balance in fishes with bimodal respiration. *Journal of Fish Biology*, 84, 682–704. DOI: 10.1111/jfb.12310.
- Shih, H. J. (1940). On the foods of *Monopterus*. *Sinensia* 11, 573-576.
- Stormer, J., Jensen, F. B. & Rankin, J. C. (1996). Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects on ionic balance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 53, 1943–1950.  
<https://doi.org/10.1139/f96-142>.
- Taylor, J. (1831). On the respiratory organs and air bladder of certain fishes of the ganges the phylogeny and systematics of synbranchiform fishes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 157, 1–70.
- Thinh, P. V., Huong, D. T. T., Gam, L. T. H., Damsgaard C., Phuong, N. T., Bayley & M., Wang, T. (2019). Renal acid excretion contributes to acid- base regulation during hypercapnia in air-exposed swamp eel (*Monopterus albus*). *Journal of Experimental Biology*, 222(9), jeb198259.  
DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.198259>
- Truchot, J. P. (1987). *Comparative aspects of extracellular acid–base balance*. Berlin: Springer-Verlag. 254 pages.
- Vleeming, W., Van De Kuil, A., te Biesebeek, J. D., Meulenbelt, J., & Boink, A. B. T. J. (1997). Effect of nitrite on blood pressure in anaesthetized and free-moving rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35(6), 615–619. DOI: 10.1016/s0278-6915(97)00015-x
- Williams, E. M. & Eddy, F. B. (1986). Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology*, Part B. 156, 867–872.  
<https://doi.org/10.1007/BF00694263>.
- Wood, C. M. (1991). Branchial ion and acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. *Physiological Zoology*, 64, 68–102.
- Wu, H. W. & Lui, C. K. (1943). The bucco-pharyngeal epithelium as the principal respiratory organ in *Monopterus javanensis*. *Sinensia* 221–239.