

# XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ LC<sub>50</sub> ĐỒNG ĐỐI VỚI CÁ NGƯA VĂN (*Danio rerio*) Ở GIAI ĐOẠN PHÔI VÀ ÁU TRÙNG

Trịnh Minh Hằng<sup>1</sup>, Bùi Thị Hoa<sup>2</sup>, Lê Thu Hà<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học

<sup>2</sup>Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Sư sống,  
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

## Tóm tắt

Đồng (Cu) là một nguyên tố hóa học không thể thiếu trong cơ thể sinh vật, là thành phần hóa học của nhiều loại enzyme quan trọng. Tuy nhiên, nếu cơ thể sinh vật thừa đồng lại dẫn đến hậu quả vô cùng nghiêm trọng. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định chỉ số của cá ngựa vằn (*Danio Rerio*) phơi nhiễm với đồng theo 3 độ tuổi khác nhau: 0 ngày tuổi, 3 ngày tuổi (giai đoạn dinh dưỡng trong) và 10 ngày tuổi (giai đoạn dinh dưỡng ngoài), với thời gian phơi nhiễm là 24h và 96h. Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá trị LC<sub>50</sub> đồng của cá ngựa vằn sau 24h phơi nhiễm đồng ở độ tuổi 0 ngày tuổi là  $1,47 \pm 0,16$  mg/l; ở 3 ngày tuổi là  $26,27 \pm 1,69$  mg/l và ở 10 ngày tuổi là  $6,54 \pm 0,98$  mg/l. Giá trị LC<sub>50</sub> đồng - 96 giờ của cá ngựa vằn là  $0,88$  mg/l  $\pm 0,10$  mg/l với cá 0 ngày tuổi, cá 3 ngày tuổi là  $1,17 \pm 0,52$  mg/l và  $1,11 \pm 0,08$  mg/l với cá 10 ngày tuổi. Giá trị LC<sub>50</sub> đồng của cá ngựa vằn thấp hơn giá trị LC<sub>50</sub> chì.

**Từ khóa:** Cá ngựa vằn; Đồng; *Danio Rerio*

## Abstract

**Determine the acute toxicity () of copper on embryo and larval stages of zebrafish (*Danio rerio*)**

Copper (Cu) is an essential element in living organisms since it is a constituent component of many important enzymes. However, excess copper levels may lead to very serious consequences. The purpose of this study is to determine the median lethal concentration of copper toxicity (LC<sub>50</sub>) for zebrafish (*Danio rerio*) at three different ages (0-day-old, 3-day-old and 10-day-old) with the exposure time of 24 hours and 96 hours. Findings showed that the LC<sub>50</sub> of copper for 24 hour on 0-day-old fish, 3-day-old fish, 10-day-old fish were  $1.47 \pm 0.16$ ,  $26.27 \pm 1.69$  and  $6.54 \pm 0.98$  mgCu/l, respectively. The LC<sub>50</sub> of copper for 96 hour on 0-day-old fish, 3-day-old fish, 10-day-old fish were  $0.88 \pm 0.10$ ,  $1.17 \pm 0.52$ ,  $1.11 \pm 0.08$  mgCu/l, respectively. The LC<sub>50</sub> Cu levels for zebrafish were lower than the LC<sub>50</sub> Pb levels.

**Keywords:** Zebrafish; Copper; LC<sub>50</sub>; *Danio rerio*

## 1. Mở đầu

Với nhiều chức năng sinh học, đồng (Cu) là một nguyên tố hóa học không thể thiếu trong cơ thể sinh vật [4, 10]. Đặc biệt đồng có thể thay thế vị trí của kẽm trong các enzyme làm mất hoặc rối loạn hoạt tính của enzyme [4, 9].

Cá ngựa vằn (*Danio Rerio*) là loài động vật đã và đang được nhiều phòng thí

nghiệm sử dụng trong các nghiên cứu về độc học, vì đây là loài dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, vòng đời ngắn và dễ mẫn cảm với các loại độc tố. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xác định giá trị LC<sub>50</sub> đồng của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) theo 3 độ tuổi khác nhau, đó là cá 0 ngày tuổi (phôi cá ngựa vằn vừa được thụ tinh), cá 3 ngày tuổi (cá ngựa vằn đã thoát khỏi màng phôi nhưng vẫn ở giai đoạn

dinh dưỡng trong) và cá 10 ngày tuổi (cá ngựa vẫn chuyển sang giai đoạn dinh dưỡng ngoài không sử dụng dinh dưỡng từ noãn hoàn).

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá thí nghiệm là cá ngựa vằn (*Danio rerio*) được nuôi tại Phòng nuôi động vật, Khoa Sinh học, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Trứng cá ngựa vằn thu được có thể tiến hành làm thí nghiệm nhằm xác định LC<sub>50</sub> của cá 0 ngày tuổi 3 này tuổi và 10 ngày tuổi. Hóa chất được sử dụng là CuSO<sub>4</sub> pha trong nước RO (Reverse osmosis) và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ phòng.

### 2.2. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn thí nghiệm số 203 của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế - OECD (1992) [1], cá chết được xác định dựa theo hướng dẫn thí nghiệm số 210 và 236 của OECD (2013, a; 2013, b) [7, 8].

Thí nghiệm được thực hiện với 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1 - xác định khoảng LC<sub>50</sub>: Nhằm xác định khoảng nồng độ Cu phù hợp cho thí nghiệm xác định giá trị của cá ngựa vằn. Phơi và ấu trùng cá được đem phơi nhiễm giữa khoảng nồng độ Cu rộng từ 0,01 đến 200 mg/l. Kết quả thí nghiệm cho thấy: khoảng nồng độ hẹp nhất giữa 100% cá sống và 100% cá chết ở cá 0 ngày tuổi là từ 0,1 mg/l đến 5,0 mg/l, cá 3 ngày tuổi là từ 4,0 mg/l đến 160 mg/l, cá 10 ngày tuổi là từ 0,4 mg/l đến 50 mg/l.

Giai đoạn 2 - xác định giá trị LC<sub>50</sub>: Đối với thí nghiệm xác định giá trị LC<sub>50</sub> trong 24 giờ: Cá 0 ngày tuổi dài nồng độ Cu từ 0,1 đến 5,0 mg/l và 1 mẫu đối chứng (0 mg/l); Cá 3 ngày tuổi, cá phơi nhiễm

Cu trong dải nồng độ: từ 5,0 đến 160 mg/l và 1 mẫu đối chứng (0 mg/l); Giải nồng độ Cu được sử dụng trong thí nghiệm với cá 10 ngày tuổi là từ 0,3 đến 50 mg/l và 1 mẫu đối chứng (0 mg/l).

Đối với thí nghiệm xác định giá trị LC<sub>50</sub> trong 96 giờ: cá 0 ngày tuổi được tiến hành phơi nhiễm trong dải nồng độ Cu từ 0,3 đến 5,0 mg/l và 1 lô đối chứng; cá 3 ngày tuổi được phơi nhiễm với dải nồng độ Cu từ 0,3 đến 30 mg/l và 1 lô đối chứng; cá 10 ngày tuổi được phơi nhiễm Cu trong dải nồng độ từ 0,01 đến 8,0 mg/l và 1 lô đối chứng.

Ghi kết quả: sau 24 giờ số lượng cá chết được ghi lại, những cá chết được lấy đi; 50% môi trường thí nghiệm được hút đi và thay thế bằng môi trường mới

Cá không được cho ăn trong suốt quá trình thí nghiệm. Tại mỗi lô thí nghiệm mật độ cá là 20 cá thùng/1 giếng 6 ml đối với cá 0 ngày tuổi và 10 cá thùng/1 giếng 6 ml đối với cá 3, 10 ngày tuổi. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Điều kiện môi trường thí nghiệm được duy trì trong suốt quá trình thí nghiệm với nhiệt độ 26±°C và pH 6,5 - 7,5.

### 2.3. Xử lý số liệu

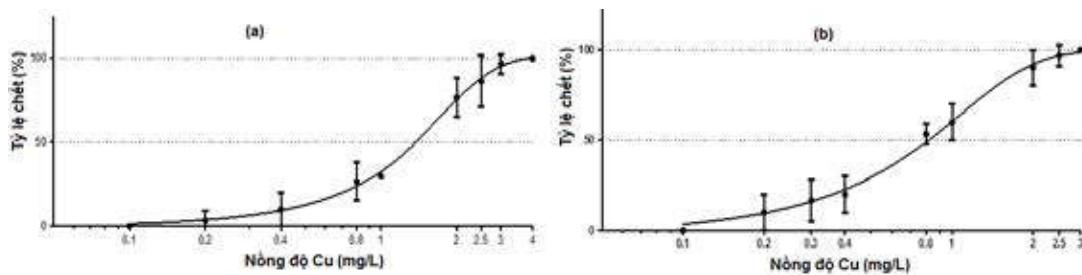
Số liệu thu được từ thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 8 theo công thức:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(\log LC_{50} - X) * HillSlope}}$$

### 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

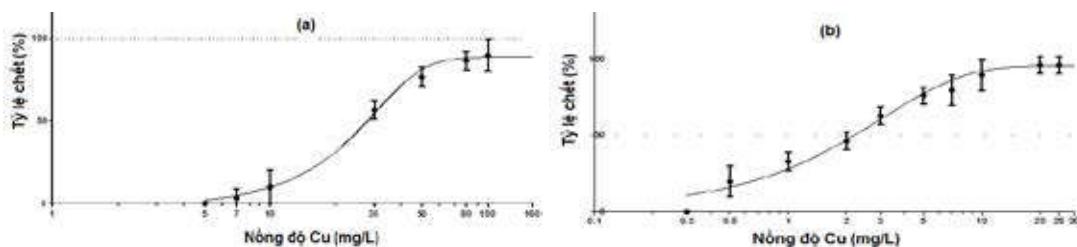
Kết quả thí nghiệm xác định chỉ số LC<sub>50</sub> Cu của cá ngựa vằn ở các độ tuổi khác nhau được thể hiện trong Hình 1, 2 và 3

## Nghiên cứu



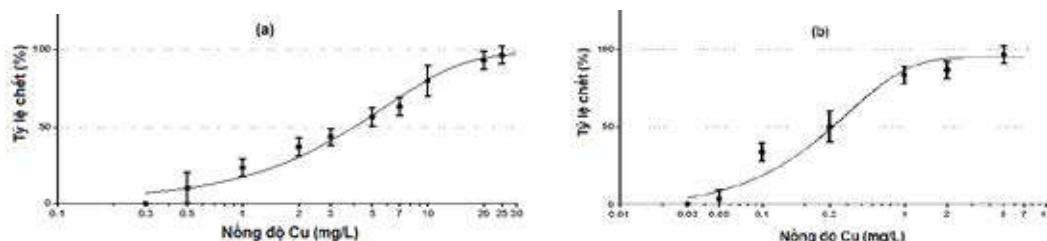
Hình 1: Tỷ lệ chết của cá ngựa vẫn 0 ngày tuổi sau 24 giờ (a) và 96 giờ (b) phơi nhiễm Cu

Kết quả nghiên cứu trong Hình 1 cho thấy: sau 24 giờ phơi nhiễm Cu, thì nồng độ Cu mà tại đó cá 0 ngày tuổi chết 100% là 4 mg/l. gấp 40 lần nồng độ Cu mà ở đó cá chưa bị chết (0,1 mg/l). Trong khi đó tỷ lệ này ở thí nghiệm 96 giờ là 60 lần (0,05 mg/l - 100% cá sống và 3 mg/l - 100% cá chết). Giá trị  $LC_{50}$  Cu của cá ngựa vẫn 0 ngày tuổi sau 24 giờ phơi nhiễm là  $1,47 \pm 0,16$  mg/l và 96 giờ phơi nhiễm là  $0,88 \text{ mg/l} \pm 0,10$  mg/l.



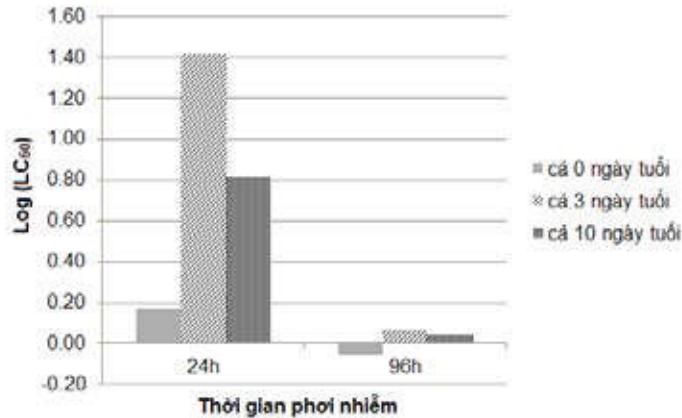
Hình 2: Tỷ lệ chết của cá ngựa vẫn 3 ngày tuổi sau 24 giờ (a) và 96 giờ (b), với mức độ phơi nhiễm Cu ở các nồng độ khác nhau

Với cá 3 ngày tuổi, sau 24 giờ phơi nhiễm, tại nồng độ 7 mg/l cá sống 100% và cá chết 100% ở nồng độ 160 mg/l; ở nồng độ 0,5 mg/l sau 96 giờ phơi nhiễm cá vẫn sống 100%, trong khi đó cá chết 100% ở nồng độ 30 mg/l. Như vậy khoảng cách giữa nồng độ Cu mà ở đó cá sống 100% và cá chết 100% sau 24 giờ và 96 giờ phơi nhiễm có sự khác biệt rất lớn, gấp gần 23 lần ở thí nghiệm 24 giờ và 60 lần ở thí nghiệm 96 giờ. Kết quả phân tích số liệu xác định được giá trị  $LC_{50}$  Cu của cá ngựa vẫn 3 ngày tuổi sau 24 giờ và 96 giờ phơi nhiễm lần lượt là  $26,27 \pm 1,69$  mg/l và  $1,17 \pm 0,52$  mg/l.

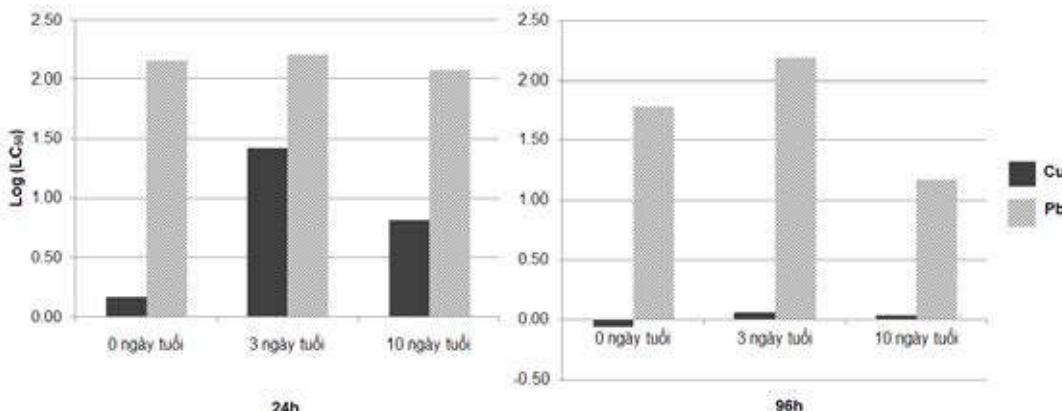


Hình 3: Tỷ lệ chết của cá ngựa vẫn 3 ngày tuổi sau 24 giờ (a) và 96 giờ (b), với mức độ phơi nhiễm Cu ở các nồng độ khác nhau

Với cá ngựa vẫn 10 ngày tuổi, nồng độ bắt đầu khiến cá chết sau 24 giờ phơi nhiễm là 0,5 mg/l, sau 96 giờ phơi nhiễm là 0,05 mg/l và cá chết 100% sau 24 giờ phơi nhiễm ở nồng độ 50 mg/l, 96 giờ phơi nhiễm là 7 mg/l (Hình 3). Giá trị  $LC_{50}$  - 24h và  $LC_{50}$  - 96h Cu của cá ngựa vẫn lần lượt được xác định là  $6,54 \pm 0,98$  mg/l và  $1,11 \pm 0,08$  mg/l.



**Hình 4: Giá trị  $LC_{50}$  Cu của cá ngựa vằn với độ tuổi và thời gian phơi nhiễm khác nhau**



**Hình 5: So sánh giá trị Cu với Pb của cá ngựa vằn**

Kết quả so sánh giá trị  $LC_{50}$  Cu của cá ngựa vằn ở các độ tuổi khác nhau được thể hiện trong Hình 4. Số liệu cho thấy giá trị  $LC_{50}$  Cu của cá ngựa vằn ở 0 ngày tuổi là thấp nhất và cao nhất ở cá 3 ngày tuổi ở cả 2 thời gian phơi nhiễm 24 giờ và 96 giờ. Như vậy ở giai đoạn dinh dưỡng trong cá 0 ngày tuổi nhạy cảm với Cu hơn cá 3 ngày tuổi và ở giai đoạn dinh dưỡng trong cá ngựa vằn ít nhạy cảm với Cu hơn so với giai đoạn dinh dưỡng ngoài. Kết quả này tương tự như các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác, như nghiên cứu của Ghareedaashi *et al.*, (2013) trên loài *Ctenopharyngodon idella* và *Rutilus frisii kutum* [2], của Nguyễn Thị Nhân và

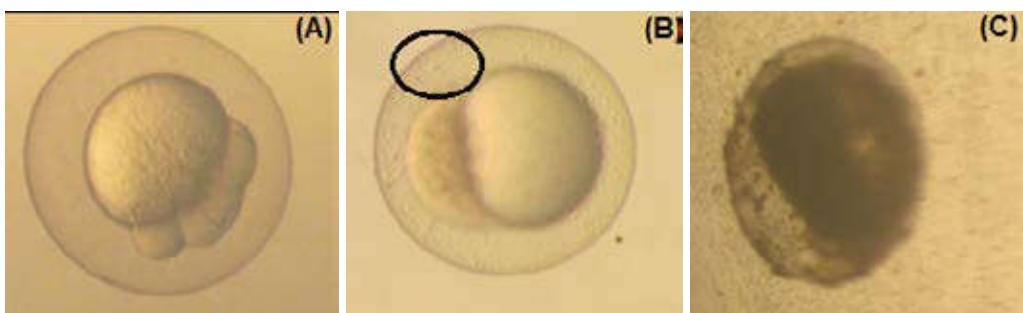
nnk trên loài *Danio Rerio* (2015) [6], của Nguyễn Thúy Hường và nnk (2020) trên loài *Oryzias latipes* [5].

Hình 5 thể hiện giá trị  $LC_{50}$  Cu và  $LC_{50}$  Pb (Nguyễn Thị Nhân và nnk, 2015) [6]. Số liệu cho thấy giá trị  $LC_{50}$  của cá ngựa vằn khi phơi nhiễm với Pb cao hơn Cu ở cả 3 độ tuổi và 2 thời gian phơi nhiễm. Giá trị  $LC_{50}$  Pb của cá ngựa vằn gấp từ 6 đến 99 lần giá trị  $LC_{50}$  Cu. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả Hamed Nekoubin *et al* (2012) [3]. Như vậy khả năng chống chịu của cá ngựa vằn đối với kim loại cần cho sự sống là Cu, thấp hơn rất nhiều so với kim loại không cần cho sự sống là Pb. Điều đó cho

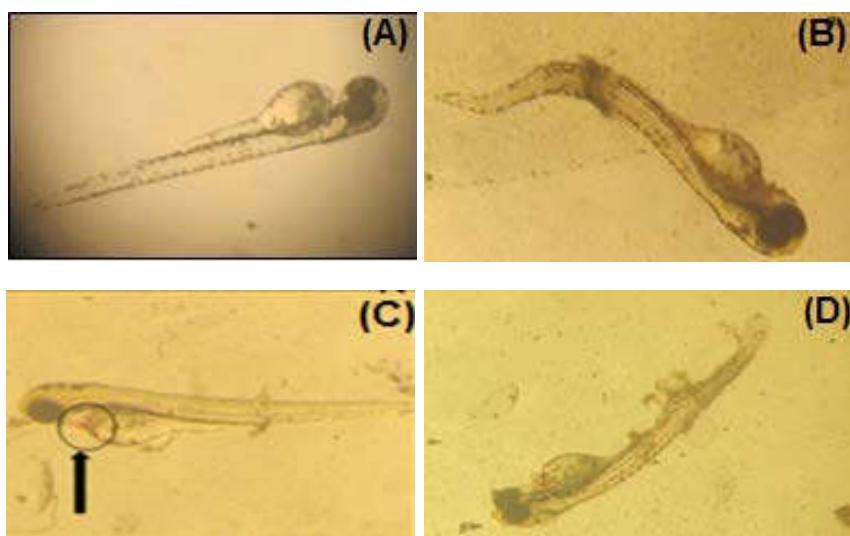
## Nghiên cứu

thấy, với kim loại không cần cho sự sống thì cá ngựa vẫn cần phải tích tụ vào cơ thể một lượng rất lớn thì mới gây tác động đến sự sống của cá. Nhưng với kim loại cần cho sự sống thì khi hàm lượng kim loại đó nhiều hơn lượng cần của cơ thể thì lập tức một số chức năng sinh lý của cơ thể sinh vật sẽ bị tác động.

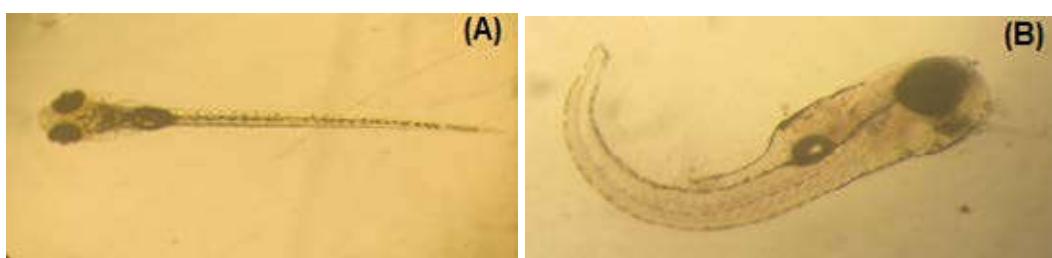
Mặc dù Cu là nguyên tố kim loại sinh học cần cho sự sinh trưởng và phát triển của cá nhưng khi phơi nhiễm với nồng độ cao thì những dị dạng và bất thường vẫn xuất hiện. Trong quá trình phơi nhiễm Cu, cá ngựa vẫn ở cả 3 độ tuổi đều biểu hiện các dị dạng (Hình 6, 7 và 8).



**Hình 6: Cá 0 ngày tuổi (A. Đồi chứng: tròn nhẵn; B. trứng cá phơi nhiễm Cu sau 2 giờ xuất hiện các chấm sần; C trứng cá bị chết)**



**Hình 7: Cá 3 ngày tuổi (A. Đồi chứng; B. Cong đuôi; C. Dị dạng mạch máu; D. Hoại tử)**



**Hình 8: Cá 10 ngày tuổi (A. Đồi chứng; B. Dị dạng)**

#### 4. Kết luận

Giá trị LC<sub>50</sub> Cu của cá ngựa vằn sau 24 giờ phơi nhiễm ở độ tuổi 0 ngày tuổi là  $1,47 \pm 0,16$  mg/l; ở 3 ngày tuổi là  $26,27 \pm 1,69$  mg/l và ở 10 ngày tuổi là  $6,54 \pm 0,98$  mg/l. Giá trị LC<sub>50</sub> đồng - 96 giờ của cá ngựa vằn là  $0,88 \text{ mg/l} \pm 0,10 \text{ mg/l}$  với cá 0 ngày tuổi, cá 3 ngày tuổi là  $1,17 \pm 0,52$  mg/l và  $1,11 \pm 0,08$  mg/l với cá 10 ngày tuổi. Yếu tố thời gian phơi nhiễm có ảnh hưởng đến giá trị của cá ngựa vằn, theo chiều hướng thời gian phơi nhiễm càng tăng thì giá trị càng giảm. Ở giai đoạn dinh dưỡng trong (0 và 3 ngày tuổi) cá ngựa vằn ít nhạy cảm với đồng hơn so với ở giai đoạn dinh dưỡng ngoài (10 ngày tuổi). Cá ngựa vằn nhạy cảm với đồng hơn so với chì.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ và giúp đỡ về địa điểm thí nghiệm và tài liệu của PGS. TS. Nguyễn Lai Thành và ThS. Nguyễn Thị Nhân.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- [1]. Co-operation O. f. E. and Development (1992). *Test No. 203: Fish, acute toxicity test*. OECD Publishing.
  - [2]. Gharedaashi E., M. R. Imanpour and V. Taghizadeh (2013). *Determination of median lethal concentration (LC50) of copper sulfate and lead nitrate and effects on behavior in Caspian sea kutum (Rutilus frisii kutum)*. Journal of Toxicology Environmental Health Sciences. 5(1), pp. 12.
  - [3]. Hamed Nekoubin et al (2012). *Determination of LC<sub>50</sub> of Copper Sulfate and Lead(II) Nitrate and Behavioral Responses of Grass Carp (Ctenopharyngodon idella)*. Walailak J Sci & Tech 2012; 9(4).
  - [4]. Mason C.F. (1996). *Biology of freshwater pollution*. Third edition, Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd, Singapore.
  - [5]. Nguyễn Thúy Hường, Bùi Thị Hoa, Lê Thu Hà (2020). *Xác định giá trị LC<sub>50</sub> của chì đối với cá Medaka (Oryzias latipes) ở giai đoạn phôi và áu trùng*. Báo cáo Khoa học về Nghiên cứu và Giảng dạy Sinh học ở Việt Nam, Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 4, tr. 535 - 541.
  - [6]. Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Lai Thành, Lê Thu Hà (2015). *Xác định giá trị của chì đối với cá ngựa vằn (Danio rerio) ở giai đoạn phôi và áu trùng*. Báo cáo khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ 6, NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr. 1546 - 1550.
  - [7]. Organisation de coopération et de développement économiques (2013, a). *Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. OECD Publishing.
  - [8]. Organisation de coopération et de développement économiques (2013, b). *Test No. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test*. OECD Publishing.
  - [9]. Trịnh Thị Thanh (2008). *Độc học, môi trường và sức khỏe con người*. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
  - [10]. United States (2004). *Toxicological Profile for Copper*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry; Syracuse Research Corporation. U.S. Dept of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- BBT nhận bài: 02/11/2020; Phản biện xong: 10/11/2020; Chấp nhận đăng: 15/12/2020