

## XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ LC<sub>50</sub> CỦA CHÌ ĐỐI VỚI CÁ SÓC (*Oryzias latipes*) Ở GIAI ĐOẠN PHÔI VÀ ẤU TRÙNG

Ngô Thúy Hường<sup>1</sup>, Bùi Thị Hoa<sup>1,2</sup>, Lê Thu Hà<sup>1,2,\*</sup>

**Tóm tắt:** Chì là kim loại không cần thiết cho sự sống nên khi chì có mặt trong nước với nồng độ nhỏ hay lớn đều tạo ra những tác động không tốt đến cơ thể sinh vật. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định chỉ số LC<sub>50</sub> của cá Sóc (*Oryzias latipes*) phơi nhiễm với chì theo 3 độ tuổi khác nhau: 0 ngày tuổi, 5 ngày tuổi (giai đoạn dinh dưỡng trong) và 10 ngày tuổi (giai đoạn dinh dưỡng ngoài). Kết quả nghiên cứu cho thấy giá trị LC<sub>50</sub> của cá Sóc sau 24h phơi nhiễm chì ở độ tuổi 0 ngày tuổi là 121,9 mg/L, 5 ngày tuổi là 289,9 mg/L và 10 ngày tuổi là 18,28 mg/L. Sau 48h phơi nhiễm chì thì giá trị LC<sub>50</sub> lần lượt là: 0 ngày tuổi - 102,0 mg/L, 5 ngày tuổi - 163,7 mg/L và 10 ngày tuổi - 10,32 mg/L. Cá Sóc có thời gian nở là từ 7 đến 9 ngày, do vậy giá trị LC<sub>50</sub> sau 96h phơi nhiễm chỉ xác định với 2 độ tuổi là 0 ngày tuổi và 10 ngày tuổi. Kết quả thí nghiệm cho thấy LC<sub>50</sub> chì - 96h của cá Sóc là 82,34 mg/L với cá 0 ngày tuổi và 7,59 mg/L với cá 10 ngày tuổi. Như vậy cá Sóc ở giai đoạn dinh dưỡng trong ít nhạy cảm với chì hơn giai đoạn dinh dưỡng ngoài.

**Từ khóa:** *Oryzias latipes*, cá Sóc, chì, LC<sub>50</sub>.

### 1. MỞ ĐẦU

Cùng với sự phát triển của ngành công nghiệp, vấn đề ô nhiễm kim loại nặng, đặc biệt là kim loại chì trở thành một vấn đề hết sức nghiêm trọng (Mills et al., 2012). Nhờ vào những ưu điểm nổi trội trong sản xuất, kim loại chì và các hợp chất của chì được sử dụng rộng rãi trong đời sống con người và phát tán rộng rãi trong môi trường sống. Chì (Pb) là kim loại không cần thiết cho sự sống nên khi chì có mặt trong nước với nồng độ nhỏ hay lớn đều tạo ra những tác động không tốt đến cơ thể sinh vật, bao gồm cả con người. Tiếp xúc với chì và hợp chất của chì trong một thời gian dài, các hệ thống cơ quan trong cơ thể sinh vật có thể bị ảnh hưởng và sinh vật có nguy cơ mắc các bệnh lý nghiêm trọng (Abadin et al., 2007). Cá Sóc *O. latipes* là loài động vật thí nghiệm đã và đang được nhiều phòng thí nghiệm sử dụng trong các nghiên cứu về độc học. Đây là loài dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, vòng đời ngắn do vậy việc thực hiện nghiên cứu độc học trên loài cá Sóc có thể cho thấy mức độ ảnh hưởng của chất gây ô nhiễm theo độ tuổi. Trong thực tế, đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện xác định chỉ số LC<sub>50</sub> trên các đối tượng cá khác nhau (Gharedaashi et al., 2013; Taweel et al., 2013; Latif et al., 2014), tuy nhiên vẫn chưa có nhiều các nghiên cứu về sự thay đổi của chỉ số LC<sub>50</sub> theo độ tuổi của cá. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định chỉ số LC<sub>50</sub> của cá Sóc (*O. latipes*) theo 3 độ tuổi khác nhau: 0 ngày tuổi, 5 ngày tuổi (giai đoạn dinh dưỡng trong) và 10 ngày tuổi

<sup>1</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Trung tâm nghiên cứu Khoa học Sự Sống, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

\*Email: lethuha@hus.edu.vn

(giai đoạn dinh dưỡng ngoài); và so sánh với kết quả nghiên cứu đã được thực hiện trước đây trên đối tượng là cá ngựa vằn (*Danio rerio*) (Nguyễn Thị Nhân và nnk. 2015) để định hướng lựa chọn loài cá thí nghiệm đánh giá mức độ độc hại của chì cũng như các sản phẩm có chứa chì.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá thí nghiệm là cá Sóc, *O. latipes*, được cung cấp từ Trường Đại học Quốc gia Singapore và nuôi duy trì tại phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh lý học và Sinh học người, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Cá được ghép theo tỉ lệ 2 cái : 1 đực (Kinoshita et al., 2009), cho đẻ trứng. Thí nghiệm LC<sub>50</sub> được tiến hành trên cá 0 ngày tuổi, 5 ngày tuổi và 10 ngày tuổi. Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm là muối Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> được pha trong dung dịch E3 (nước RO bổ sung muối NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) và được bảo quản tại nhiệt độ phòng.

### 2.2. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn thí nghiệm số 203 của OECD (1992), cá chết được xác định dựa theo hướng dẫn thí nghiệm số 210 và 236 của OECD (2013, a; 2013, b).

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 Pb phù hợp cho thí nghiệm xác định giá trị LC<sub>50</sub> của cá Sóc, phôi và ấu trùng cá được đem phơi nhiễm giữa khoảng nồng độ rộng. Cụ thể: cá 0 ngày tuổi phơi nhiễm trong 9 nồng độ Pb khác nhau trải dài từ 0 mg/L đến 1200 mg/L; cá 5 ngày tuổi được phơi nhiễm trong 7 nồng độ chì khác nhau trải từ 0 mg/L đến 350 mg/L và cá 10 ngày tuổi phơi nhiễm trong 7 nồng độ chì từ 0 mg/l 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 20 và 500 mg/L, cá 5 ngày tuổi là 20 và 400 mg/L, cá 10 ngày tuổi là 5 và 30 mg/L.

Giai đoạn 2 - xác định giá trị LC<sub>50</sub>: Căn cứ vào kết quả thí nghiệm xác định khoảng LC<sub>50</sub>, thí nghiệm xác định giá trị LC<sub>50</sub> được thiết kế với các dải nồng độ như sau: Cá 0 ngày tuổi dải nồng độ Pb là 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L và 1 mẫu đối chứng (0 mg/L); Cá 5 ngày tuổi, cá phơi nhiễm Pb trong dải nồng độ: 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400 mg/L và 1 mẫu đối chứng (0 mg/L); Dải nồng độ Pb được sử dụng trong thí nghiệm với cá 10 ngày tuổi là: 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/L và 1 mẫu đối chứng (0 mg/L).

Tại mỗi lô thí nghiệm, mật độ cá là 11 cá thể/giếng chứa 6 mL dung dịch muối Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> với các nồng độ Pb đã xác định ở trên. Sau mỗi 24 giờ, số lượng cá chết được ghi lại, những cá thể chết được lấy đi. Với cá 0 và 10 ngày tuổi, thời gian phơi nhiễm chì tối đa là 96 giờ; với cá 5 ngày tuổi, thời gian phơi nhiễm chì tối đa là 48 giờ. Nguyên nhân của sự khác biệt trong thời gian phơi nhiễm chì này là do thời điểm nở của cá Sóc là từ 7-9 ngày sau thụ tinh, nếu cá ngày 5 phơi nhiễm chì quá 48 giờ thì có thể màng đệm sẽ bị vỡ và kết quả của thí nghiệm sẽ bị thay đổi.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và luôn được duy trì ổn định tại nhiệt độ  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  và pH 6,5 - 7,5.

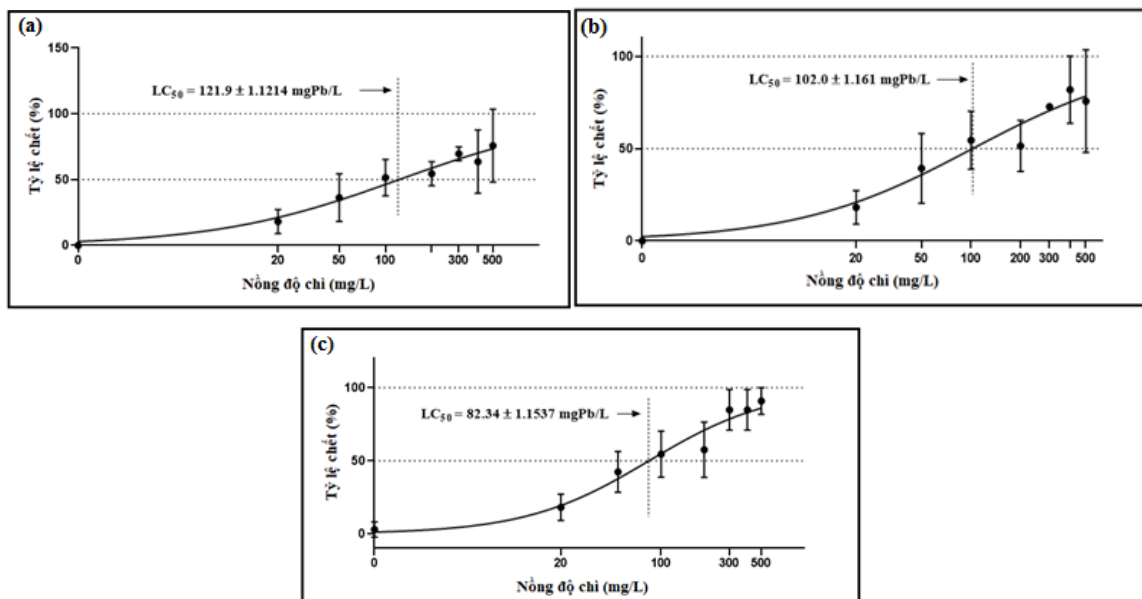
### 2.3. Xử lý số liệu

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 VÀ THẢO LUẬN

Kết quả của thí nghiệm xác định chỉ số  $LC_{50}$  chì của cá Sóc 0 ngày tuổi, 5 ngày tuổi và 10 ngày tuổi được trình bày lần lượt trong các Hình 1, Hình 2 và Hình 3.

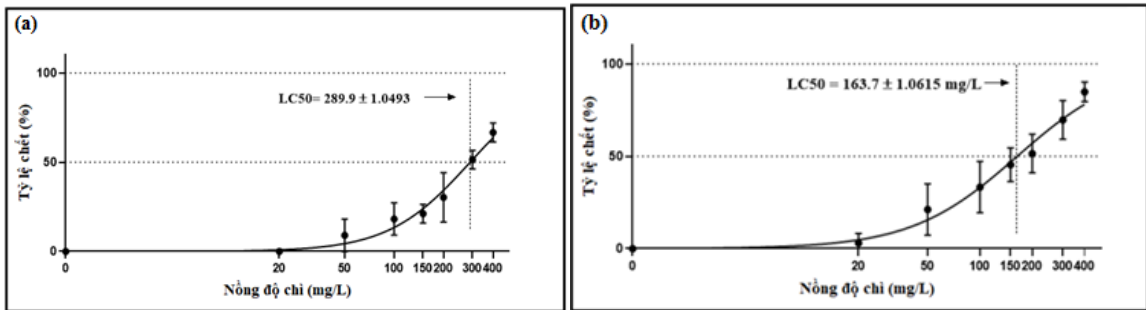


**Hình 1.** Tỷ lệ chết của cá Sóc 0 ngày tuổi sau 24 giờ (a), sau 48 giờ (b) và sau 96 giờ (c) phơi nhiễm chì

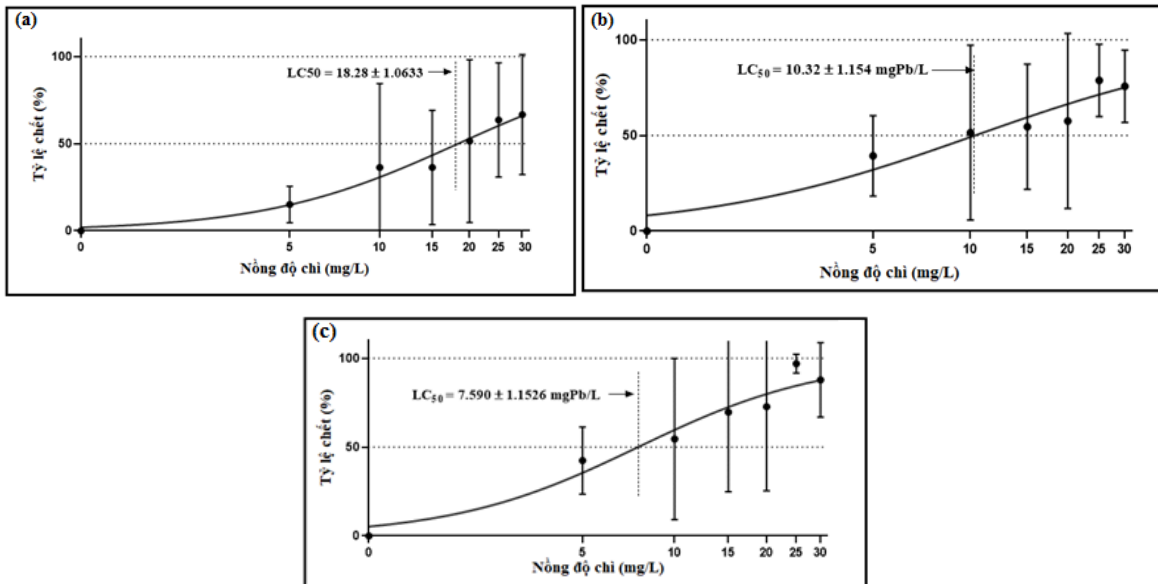
Giá trị  $LC_{50}$  chì của cá Sóc 0 ngày tuổi (Hình 1) sau 24 giờ, 48 giờ và 96 giờ phơi nhiễm lần lượt là  $121,9 \pm 1,1214 \text{ mg/L}$ ,  $102,0 \pm 1,161 \text{ mg/L}$  và  $82,34 \pm 1,1537 \text{ mg/L}$ . Như vậy giá trị  $LC_{50}$ -24h cao hơn 1,2 lần so với giá trị  $LC_{50}$ -48h và xấp xỉ 1,5 lần so với giá trị  $LC_{50}$ -96h.

Giá trị  $LC_{50}$  chì của cá Sóc 5 ngày tuổi sau 24 giờ phơi nhiễm là  $289,9 \pm 1,0493 \text{ mg/L}$  và 48 giờ phơi nhiễm là  $163,7 \pm 1,0615 \text{ mg/L}$  (Hình 2). Như vậy, giá trị  $LC_{50}$ -24h của cá Sóc 5 ngày tuổi cao hơn giá trị  $LC_{50}$ -48h xấp xỉ 1,8 lần.

Tại thí nghiệm với đối tượng cá Sóc 10 ngày tuổi (Hình 3), giá trị  $LC_{50}$  chì sau 24 giờ, 48 giờ và 96 giờ phơi nhiễm lần lượt là  $18,28 \pm 1,0633 \text{ mg/L}$ ,  $10,32 \pm 1,154 \text{ mg/L}$  và  $7,590 \pm 1,1526 \text{ mg/L}$ . Giá trị  $LC_{50}$ -24h cao hơn giá trị  $LC_{50}$ -48h và  $LC_{50}$ -96h lần lượt là 1,77 và 2,4 lần.



**Hình 2.** Tỷ lệ chết của cá Sóc 5 ngày tuổi sau 24 giờ (a) và sau 48 giờ (b) phơi nhiễm chì



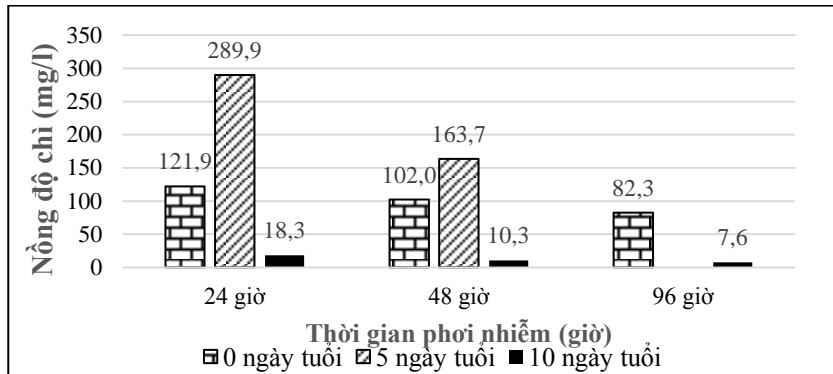
**Hình 3.** Tỷ lệ chết của cá Sóc 10 ngày tuổi sau 24 giờ (a), sau 48 giờ (b) và sau 96 giờ (c) phơi nhiễm chì

Các kết quả nghiên cứu trên cho thấy thời gian phơi nhiễm có ảnh hưởng lớn đến giá trị  $LC_{50}$  chì của cá Sóc ở cả 3 độ tuổi là 0 tuổi, 5 tuổi và 10 tuổi. Kết quả này chỉ ra rằng: yếu tố thời gian phơi nhiễm có ảnh hưởng đến giá trị  $LC_{50}$  ở cá Sóc thời gian phơi nhiễm càng dài thì giá trị  $LC_{50}$  càng thấp. Kết quả thí nghiệm trong nghiên cứu này tương tự như các kết quả nghiên cứu của các tác giả khác, như nghiên cứu của Gharedaashi et al., (2013) trên loài *Ctenopharyngodon idella* và *Rutilus frisii kutum*, của Nguyễn Thị Nhân và nnk. (2015) trên loài *Danio rerio*.

Kết quả so sánh giá trị  $LC_{50}$  chì của cá Sóc ở các độ tuổi khác nhau được thể hiện trong Hình 4.

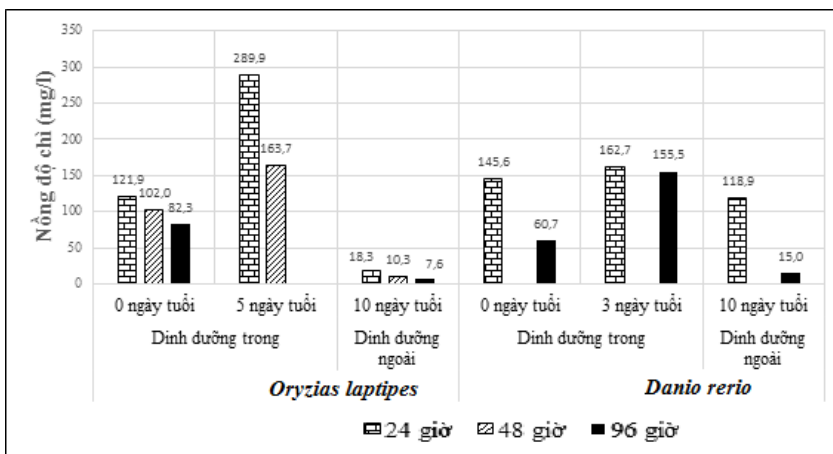
Theo Hình 4, giá trị  $LC_{50}$  chì của cá Sóc 10 ngày tuổi thấp hơn so với cá 0 và 5 ngày tuổi. Như vậy, ở giai đoạn dinh dưỡng ngoài cá Sóc nhạy cảm với chì hơn so với ở giai đoạn dinh dưỡng trong. Điều này cho thấy vai trò của màng phôi trong việc bảo vệ phôi cá chống lại các chất độc ngoài môi trường sống. Ngoài ra, giá trị  $LC_{50}$  của cá Sóc 5 ngày tuổi cao hơn rõ rệt so với giá trị này của cá 0 ngày tuổi (2,3 lần với thí nghiệm sau 24 giờ phơi nhiễm và 1,6

lần với thí nghiệm sau 48 giờ phơi nhiễm) và 10 ngày tuổi (xấp xỉ 16 lần đối với thí nghiệm sau 24 giờ phơi nhiễm và thí nghiệm sau 48 giờ phơi nhiễm) chứng tỏ cá 5 ngày tuổi có khả năng chống chịu tốt nhất đối với kim loại chì khi so sánh trong ba độ tuổi 0, 5 và 10 ngày. Điều này có thể giải thích bởi thực tế, cá 5 ngày tuổi đã phát triển ổn định hơn so với cá 0 ngày tuổi; thêm vào đó vẫn nằm trong màng phôi và sử dụng dinh dưỡng trong khi đem so sánh với cá 10 ngày tuổi. Kết quả nghiên cứu này tương tự kết của nghiên cứu của Nguyễn Thị Nhân và nnk (2015) trên loài *Danio rerio*.



**Hình 4.** Giá trị LC<sub>50</sub> đối với kim loại chì của cá *Medaka* tại các độ tuổi và khoảng thời gian phơi nhiễm khác nhau

So sánh kết quả của thí nghiệm này với kết quả nghiên cứu trước lấy đối tượng là cá ngựa vằn (*Danio rerio*) của tác giả Nguyễn Thị Nhân và nnk. (2015), thấy được sự tương tự. Cụ thể, giá trị LC<sub>50</sub> của cá trước khi nở (0 và 3 ngày tuổi đối với cá ngựa vằn, 0 và 5 ngày tuổi đối với cá Sóc) ở tất cả các khoảng thời gian phơi nhiễm đều cao hơn so với cá sau khi nở (10 ngày tuổi đối với cả hai loài) (Hình 5). Điều này cho thấy không nên sử dụng cá ở độ tuổi dinh dưỡng trong để đánh giá mức độ ảnh hưởng của chất gây ô nhiễm lên sinh vật thí nghiệm vì như vậy có thể đưa ra nhận định không chính xác về độ độc hại của chất gây ô nhiễm với sinh vật thí nghiệm nói riêng và môi trường nói chung.



**Hình 5.** Giá trị LC<sub>50</sub> của chì đối với cá *Oryzias latipes* và cá *Danio rerio* (Nguyễn Thị Nhân và nnk. 2015)

Thêm vào đó, kết quả của hai thí nghiệm cho thấy cá Sóc nhạy cảm với kim loại chì hơn so với cá ngựa vằn. Do vậy, nên sử dụng cá Sóc trong các thí nghiệm liên quan đến đánh giá ảnh hưởng của chì và các sản phẩm chứa chì đến môi trường trong các thí nghiệm tiếp theo.

Tiếp tục so sánh với các nghiên cứu khác lấy đối tượng là ấu trùng cá *Ctenopharyngodon idella* và *Rutilus frisii kutum* (Gharedaashi et al., 2013), *Labeo rohita* (Abdul et al., 2014) hay *Oreochromis niloticus* (Abdulali et al., 2013), nhận thấy được các kết quả với xu hướng tương tự. Đồng thời cá Sóc nhạy cảm hơn các loài *Ctenopharyngodon idella* và *Rutilus frisii kutum*; và ít nhạy cảm hơn các loài *Labeo rohita* và *Oreochromis niloticus*.

#### 4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy: Yếu tố thời gian phơi nhiễm có ảnh hưởng đến giá trị LC<sub>50</sub> của cá Sóc, theo chiều hướng thời gian phơi nhiễm càng tăng, giá trị LC<sub>50</sub> càng giảm. Cá Sóc trong giai đoạn dinh dưỡng trong (0 và 5 ngày tuổi) ít nhạy cảm với kim loại chì hơn so với ở giai đoạn dinh dưỡng ngoài (10 ngày tuổi). Cá Sóc nhạy cảm với kim loại chì hơn so với cá ngựa vằn.

*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 TS. Tô Thanh Thúy và ThS. Nguyễn Thị Nhân.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abadin H., A. Ashizawa, F. Lladós and Y.-W. Stevens (2007), Toxicological profile for lead.
- Co-operation O. f. E. and Development (1992), Test No. 203: Fish, acute toxicity test, OECD Publishing.
- Gharedaashi E., M. R. Imanpour and V. Taghizadeh (2013), Determination of median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) 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.
- Kinoshita M., K. Murata, K. Naruse and M. Tanaka (2009), Medaka: biology, management, and experimental protocols.
- Latif A., M. Khalid and M. Ali (2014), Evaluation of toxic stress of copper sulphate and lead nitrate on hematological and serum biochemical characteristics of freshwater cyprinid (*Labeo rohita*), Int. J. Current Engg. Technol. 4, pp. 366.
- Mills-Knapp S., K. Traore, B. Ericson, J. Keith, D. Hanrahan and J. Caravanos (2012), The World's worst pollution problems: assessing health risks at hazardous waste sites, Blacksmith Institute, New York.
- Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Lai Thành và Lê Thu Hà (2015), Xác định giá trị LC<sub>50</sub> của chì đối với cá ngựa vằn (*Danio rerio*) ở giai đoạn phôi và ấu trùng. Báo cáo khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ 6, NXB Viện Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr. 1546 - 1550.

Organisation de coopération et de développement économiques (2013, a), Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD Publishing.

Organisation de coopération et de développement économiques (2013, b), Test No. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test, OECD Publishing.

Taweel A., M. Shuhaimi-Othman and A. K. Ahmad (2013), Assessment of heavy metals in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from the Langat River and Engineering Lake in Bangi, Malaysia, and evaluation of the health risk from tilapia consumption, *Ecotoxicol Environ Saf.* 93(5), pp. 45.

## DETERMINATION OF THE ACUTE TOXICITY (LC<sub>50</sub>) OF LEAD ON MEDAKA FISH (*Oryzias latipes*) IN EMBRYONIC AND EARLY LARVAL STAGES

Ngo Thuy Huong<sup>1</sup>, Bui Thi Hoa<sup>2</sup>, Le Thu Ha<sup>1,2,\*</sup>

**Abstract:** With the development of industries worldwide, human standards of living has been improved. Besides plenty of advantages, this improvement has brought about several negative impacts on the environment and public health. Among various types of pollutants, lead, a heavy metal element, is considered one of the most common pollutant. This research focuses on the relationship of lead toxicity by age and exposure time in Medaka fish (*Oryzias latipes*), a species which has not been selected as a model for lead toxicity study in Vietnam before. According to the results, the LC<sub>50</sub> values of lead for 24 hours in 0-day-old fish, 5-day-old fish, 10-day old fish were 121.9 mg/L, 289.9 mg/L, 18.28 mg/L, respectively. The LC<sub>50</sub> values of lead for 48 hours in 0-day-old fish, 5-day-old fish, 10-day old fish were 102.0 mg/L, 163.7 mg/L, 10.32 mg/L, respectively. Finally, the LC<sub>50</sub> values of lead for 96 hours in 0-day-old fish, 10-day-old fish were 82.34 mg/L, 7.59 mg/L. Additionally, the study's results were compared with the previous study of *Danio rerio*.

**Keywords:** *Oryzias latipes*, Medaka, lead, LC<sub>50</sub>.

<sup>1</sup>Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

<sup>2</sup>Centre for Life Science Research, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

\*Email: lethuha@hus.edu.vn