

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGÔ VĂN TUẤN

“NGHIÊN CỨU SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb) ĐỐI  
VỚI QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN CỦA CÁ NGỰA VẪN  
(*Danio rerio*)”

Chuyên ngành: Sinh thái học

Mã số: 9420120

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH THÁI HỌC

Hà Nội – Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS. TS Nguyễn Thị Nga

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS. TS Nguyễn Thị Phương Thảo

Phản biện 1: ...

Phản biện 2: ...

Phản biện 3: ....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..', ngày ... tháng ... năm 202....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của luận án

Ở Việt Nam, việc đánh giá tác động của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên động vật thủy sinh chủ yếu bằng các phương pháp hóa lý, đã có nhiều công trình nghiên cứu nhưng chưa có sự đánh giá một cách toàn diện, sâu sắc lên sự phát triển của các động vật thủy sinh nhất là động vật có xương sống.

Để hiểu sâu hơn về ảnh hưởng tác động của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên quá trình phát triển cá ngựa vằn cần có nhiều nghiên cứu về tác động của nó lên tất cả quá trình phát triển từ giai đoạn phôi cho đến cá trưởng thành, sự thay đổi cấu trúc gen, sự thay đổi cấu trúc mô ruột và buồng trứng, nhịp tim, tích tụ chì trong nội quan, cơ và xương,... từ đó rút ra ảnh hưởng tác động của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên cơ thể con người. Nên tác giả đề xuất đề tài nghiên cứu là “Nghiên cứu sự ảnh hưởng chì (Pb) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)” là hết sức cấp thiết, có ý nghĩa về khoa học và thực tiễn cao nhằm cung cấp các cơ sở khoa học cho việc đánh giá ảnh hưởng kim loại nặng lên động vật thủy sinh, động vật có xương sống đặc biệt là con người. Đồng thời đó cũng là tiền đề sử dụng cá ngựa vằn như một sinh vật mô hình thử nghiệm, đánh giá độc học, tính kháng thuốc trong y khoa, sử dụng nghiên cứu trong y học.

### 2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Đánh giá ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) giai đoạn phôi, ấu trùng và cá trưởng thành thông qua những thay đổi về mặt hình thái học, mô học, mức độ biểu hiện gen. Góp phần làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về khả năng tích lũy, ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên con người và động vật.

### 3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

Để thực hiện mục tiêu tổng quát trên, tác giả đã tiến hành thực hiện các mục tiêu cụ thể sau:

Xác định sự ảnh hưởng nồng độ chì lên sự phát triển của phôi cá ngựa vằn và đồng thời xác định hàm lượng tích tụ chì ( $Pb^{2+}$ ) trong cơ quan phát triển của cá ngựa vằn (*danio rerio*).

Xác định ảnh hưởng chì ( $Pb^{2+}$ ) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn (*danio rerio*) dùng phương pháp thu nhận mẫu, cắt lát mô”.

Xác định sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì ( $Pb^{2+}$ ) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngựa vằn (*danio rerio*).

### 4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Kết quả nghiên cứu của luận án đi sâu vào nghiên cứu độc tố của ion kim loại chì tác động lên quá trình phát triển cá ngựa vằn. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc đánh giá rủi ro của kim loại nặng lên động vật thủy sinh, động vật có xương sống đặc biệt là con người. Đồng thời đó cũng là tiền đề sử dụng cá ngựa vằn như một sinh vật mô hình thử nghiệm, đánh giá độc học, tính kháng thuốc trong y khoa, sử dụng nghiên cứu trong y học.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Tổng quan về chì ( $Pb^{2+}$ )

Chì ( $Pb^{2+}$ ) là một chất kim loại nặng bền vững trong các hợp chất hữu cơ và vô cơ. Tuy nhiên, tiếp xúc với môi trường có chì ( $Pb^{2+}$ ) có thể gây nhiễm độc cho người và sinh vật. Chì ( $Pb^{2+}$ ) có thể ảnh hưởng đến hệ thần kinh, hệ tiêu hóa, hệ tuần hoàn và hệ thống miễn dịch của con người và sinh vật khác. Chì ( $Pb^{2+}$ ) tích lũy trong cá thông qua quá trình hô hấp, tiêu hóa, qua da và qua các cơ quan bị tổn thương. Chì ( $Pb^{2+}$ ) xâm nhập vào cơ thể chủ yếu qua hấp thu chủ động và khuếch tán thụ động. Sự tích lũy sinh học trong động vật thủy sinh tùy thuộc vào giống loài, độ tuổi, dạng độc tố. Khả năng đào thải chì ( $Pb^{2+}$ ) phụ thuộc vào hỗn hợp kim loại, loài, đặc điểm sinh học của các mô. Độc chất có thể thoát khỏi đường máu và xâm nhập vào các mô, tại đây độc chất được chuyển hóa sinh học, đào thải và tích tụ.

### 1.2. Tổng quan về cá ngựa vằn

Cá được phân loại là lớp động vật thủy sinh có xương sống chủ yếu và là một thành phần không thể thiếu cho các chiến lược kiểm tra độc tố. Cá ngựa vằn là sinh vật được sử dụng phổ biến ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới từ khá lâu và trình tự hệ gen đã được giải mã đầy đủ. Các phân tích trên hệ gen cá ngựa vằn cho thấy có trên 12 nghìn gen tương đồng với hệ gen người và khoảng 70% gen của người có ít nhất một gen tương đồng trên cá ngựa vằn. Vì vậy cá ngựa vằn là mô hình thay thế đầy hứa hẹn cho nghiên cứu độc học, sử dụng các giai đoạn sống khác nhau của cá để thử nghiệm độc tính. Hơn nữa, một cá cái có thể đẻ được từ 50-200 trứng mỗi lần ghép, cá ngựa vằn có chu kỳ sinh sản nhanh, phôi cá chỉ kéo dài 4-5 ngày, trong thời gian này, ấu thể cá chưa có khả năng tự kiếm ăn được nên

chưa được coi là một cơ thể động vật. Do đó việc sử dụng phôi không bị ràng buộc bởi các quy định nghiêm ngặt đối với động vật thí nghiệm. Vì vậy, một lượng lớn phôi có thể được sinh ra một cách chủ động trong phòng thí nghiệm nên có khả năng dùng phôi đánh giá số lượng lớn các chất thí nghiệm. Trong quá trình phát triển cá ngựa vằn, phôi hình thành sớm và một số cơ quan ở cá ngựa vằn khá giống với các động vật có xương sống khác nhưng tốc độ phát triển nhanh.

Trong những năm gần đây có nhiều nhóm nghiên cứu về ảnh hưởng kim loại nặng đến cá ngựa vằn như Anandhan R và cộng sự (2013) cho thấy nhôm cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của cá ngựa vằn, Xue song Zhao và cộng sự (2013) cho thấy hạt ZnO làm chậm phôi nở và tăng dị tật ở cá ngựa vằn, Govind P và cộng sự (2014) chì ( $Pb^{2+}$ ) gây độc tính ở động vật và cá, Theo Zheng và cộng sự (2016) khi cho cá ngựa vằn tiếp xúc với kẽm, cadmium sẽ gây ra các phản ứng khác nhau đối với quá trình oxy hóa trong gan của cá ngựa vằn.

Tại Việt Nam có một số nhóm nghiên cứu kim loại nặng ảnh hưởng đến cá ngựa vằn như: Trần Thị Phương Dung (2014) đánh giá sự tác động của chì lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn - *Danio rerio* (Hamilton, 1822); Nguyễn Thị Thương Huyền, Đoàn Lê Minh Hiền, (2016) đánh giá ảnh hưởng của nồng độ kẽm lên sự sống của ấu trùng cá ngựa vằn (1-7 ngày tuổi); Nguyễn Thị Thương Huyền, Trần Thị Trúc Đào, Hoàng Nghĩa Sơn, (2018) đã đánh giá tác động của asen (As) lên quá trình phát triển phôi cá ngựa vằn.

Trên thế giới và tại Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu nhưng chưa có nghiên cứu nào hệ thống đầy đủ về ảnh hưởng của chì đến hình thái, nhịp tim, mức độ phân tử đến cá ngựa vằn, tích tụ chì

trong nội quang, cơ và xương ở các nồng độ 0,1, 1, 10, 20, 100 $\mu$ g/L ở các giai đoạn phát triển 24h, 48h, 72h và 168h.

Việc nghiên cứu tác động của các chất độc nói chung, chì ( $Pb^{2+}$ ) nói riêng đến sinh vật thủy sinh cần chọn đối tượng mô hình để nghiên cứu, tiết kiệm chi phí, thời gian ngắn, mang các đặc điểm gần giống con người, đặc biệt là giai đoạn phát triển phôi thai là rất cần thiết để hiểu biết sâu về cơ chế tác động, mức độ nguy hại cũng như đưa ra khuyến cáo nhằm xây dựng các văn bản pháp quy về bảo vệ môi trường và sức khỏe con người trong điều kiện thực tế tại Việt Nam là vô cùng cấp thiết. Với những lý do trên tác giả đã tiến hành thực hiện đề tài “Nghiên cứu sự ảnh hưởng chì (Pb) đối với quá trình phát triển của cá ngựa vằn (*Danio rerio*)”, mô hình nghiên cứu này nhận được sự quan tâm từ các nhà khoa học trên thế giới trong nhiều lĩnh vực như khoa học môi trường, dược học, hóa sinh học, y tế, nông nghiệp, khoa học vật liệu. Số lượng các công trình nghiên cứu khoa học sử dụng phôi cá ngựa vằn đã tăng qua các năm cũng minh chứng cho điều này.

## CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Tháng 1/2018 đến tháng 1/2021. Tác giả tiến hành chọn lựa con giống, tiến hành nuôi và cảm ứng các nồng độ ô nhiễm, phân tích kết quả

Địa điểm nghiên cứu: Phòng Công nghệ Sinh học động vật - Viện Sinh học nhiệt đới.

### 2.2. Vật liệu

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*), trong giai đoạn trưởng thành có chiều dài  $3,62 \pm 0,04$  cm và  $1,00 \pm 0,48$  g trọng lượng.

Hóa chất, bể nuôi, kính hiển vi, máy ảnh, dụng cụ hỗ trợ thu và lưu mẫu,...

### 2.3. Nội dung và phương pháp

#### 2.1.1. Phương pháp nuôi cá

Cá ngựa vằn được nuôi trong bể thủy tinh, có đường kính 30cm, số lượng cá nuôi 50 con, theo tỷ lệ 1 đực: 2 cái. Chọn cá trưởng thành có chiều dài  $3,62 \pm 0,04$  cm và  $1,00 \pm 0,48$  g trọng lượng, hình thái đồng đều nhau. Cá được nuôi trong bể có sục khí để đảm bảo lượng oxy hòa tan  $6,5 \pm 0,7$ mg/L, pH= 6,5-7,5, nhiệt độ 28-32<sup>o</sup>C, thức ăn của cá là rong và sinh vật phù du.

Cá đối chứng là cá được nuôi trong bể nước không có nồng độ ion kim loại chì.

Cá sinh sản là cá được nuôi trong bể nước không có nồng độ ion kim loại chì, sau khi cá đẻ trứng tác giả tiến hành thu phôi để thực hiện các thí nghiệm.

Độ lặp lại của từng thí nghiệm là 3 (n=3).

#### 2.1.2. Thí nghiệm độc tính

Môi trường đối chứng: nước không nhiễm chì (Pb<sup>2+</sup>).



Môi trường khảo nghiệm: nước không nhiễm chì pha với chì ( $Pb^{2+}$ ) ở các nồng độ 0,1 $\mu$ g/L, 1 $\mu$ g/L, 10 $\mu$ g/L, 20 $\mu$ g/L, 100 $\mu$ g/L.

Môi trường nước đối chứng và các nồng độ chì ( $Pb^{2+}$ ) luôn duy trì pH= 6,5-7,5, nhiệt độ 28-32 $^{\circ}$ C.

Mỗi bể thí nghiệm chứa 50 phôi (phôi sau khi thụ tinh).

Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần (n=3).

### ***2.1.3. Ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên tỷ lệ phát triển phôi cá ở các giai đoạn khác nhau***

Đếm số phôi nở sống trong tổng số phôi, quan sát một số bất thường của phôi và xác định số phôi nở, tìm ra tỷ lệ % phôi sống ở các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thí nghiệm sử dụng 50 phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn 1-2 tế bào, quan sát hình thái, sức sống và theo dõi tỷ lệ sống chết của phôi sau các giai đoạn phân chia (giai đoạn 24h, 48h, 72h và 168h) dưới kính hiển vi, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Phôi sống là phôi khỏe mạnh và có khả năng phát triển ở các giai đoạn tiếp theo, không dị tật, không chết.

### ***2.1.4. Ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên nhịp tim phôi cá ở các giai đoạn khác nhau***

Xác định nhịp tim ở các nồng độ khác nhau, mỗi nồng độ thí nghiệm sử dụng 50 phôi cá ngựa vằn ở giai đoạn 1-2 tế bào. Phôi đến giai đoạn 48h và 72h, phôi được hút bằng ống hút nhựa mềm với đường kính 3 mm. Sau đó, cho vào đĩa petri đường kính 60 mm có chứa đủ môi trường tương ứng để ấu trùng có thể sống được. Đưa mẫu lên kính hiển vi đảo ngược, đặt dưới vật kính X10, sử dụng máy ảnh Canon quay phim nhịp tim ấu trùng trong 1 phút, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Phôi sống là phôi khỏe mạnh và có khả năng phát triển ở các giai đoạn tiếp theo, không dị tật, không chết.

### **2.1.5. Xác định hàm lượng tích tụ chì ( $Pb^{2+}$ ) trong cơ quan phát triển của cá**

Sử dụng 50 phôi cá sẽ được nuôi trong môi trường đối chứng, môi trường có chứa các nồng độ  $Pb^{2+}$ , phôi cá được nuôi đến giai đoạn trưởng thành (3 tháng tuổi). Sau 90 ngày tiến hành thu cá. Phôi cá được thu và nuôi trong dung dịch Hank. Môi trường thu được giữ ở 4°C cho đến khi phân tích. Chỉ tiêu đánh giá: Hàm lượng chì ( $Pb^{2+}$ ) tồn dư trong cơ thể cá theo tiêu chuẩn AOAC 999.11. Sử dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ nguyên tử sau khi tro hóa khô để xác định tích tụ chì trong cá ngựa vằn.

### **2.1.6. Đánh giá ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng**

Để đánh giá ảnh hưởng chì ( $Pb^{2+}$ ) lên cấu trúc mô ruột và mô buồng trứng của cá ngựa vằn, cá sẽ được nuôi trong môi trường có chứa nồng độ  $Pb^{2+}$  từ giai đoạn phôi đến 90 ngày tuổi. Sau đó thu nhận cá, gây tê cá bằng Lidocain 2%, mổ cá để lấy các mẫu ruột và buồng trứng, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Sử dụng phương pháp nhuộm hematoxylin- eosin (HE) để xác định ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên cấu trúc mô ruột, mô buồng trứng.

### **2.1.7. Phương pháp tách chiết RNA**

Phôi sau khi thụ tinh, lựa chọn phôi không dị tật, đồng đều về hình thái, cho 100 phôi vào mỗi bể thủy tinh có chứa các nồng độ thí nghiệm khác nhau. Phôi được nuôi đến giai đoạn 24h bắt đầu thu 40 phôi, 60 phôi còn lại trong lô thí nghiệm được nuôi đến giai đoạn 168h tiến hành thu cá, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Mẫu được thu tiến hành RT-PCR. (Chọn những cá thể không dị tật về hình thái, cá được thu và bảo quản mẫu mô trong dung dịch cồn 70 độ, tủ âm 40 độ).

### ***Real-time RT-PCR***

Sự biểu hiện gen được định lượng bằng phương pháp Real-time qRT-PCR với kit PCR BIO 1-Step RT-PCR Kit).

- Phân tích định lượng tương đối sự biểu hiện các gen:

Phương pháp  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak) (Real-time PCR Applications Guide – Biorads).

Phương pháp  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  được áp dụng để đánh giá mức độ biểu hiện tương đối sự biểu hiện gen. Phương pháp này giả định rằng cả gen đích và gen tham chiếu được khuếch đại với hiệu quả gần 100% và trong phạm vi 5% của mỗi gen. Để xác định sự khác biệt tương đối trong mức độ biểu hiện của gen đích ở các mẫu khác nhau, phương pháp  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  được thực hiện theo các bước sau:

- Chuẩn hóa giá trị  $C_T$  của gen mục tiêu với gen tham khảo cho cả mẫu thí nghiệm và mẫu hiệu chỉnh:

$$\Delta C_{T(\text{mẫu})} = C_{T(\text{mục tiêu, mẫu})} - C_{T(\text{tham chiếu, mẫu})}$$

$$\Delta C_{T(\text{chuẩn})} = C_{T(\text{mục tiêu, chuẩn})} - C_{T(\text{tham chiếu, chuẩn})}$$

- Chuẩn hóa giá trị  $\Delta C_T$  của mẫu thí nghiệm với  $\Delta C_T$  của mẫu chuẩn:  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{mẫu})} - \Delta C_{T(\text{chuẩn})}$

- Cuối cùng, tỷ lệ biểu hiện được tính theo công thức: Tỷ lệ biểu hiện =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

#### **Chỉ tiêu đánh giá:**

- Sự thay đổi biểu hiện gen đáp ứng với kim loại nặng.
- Sự thay đổi biểu hiện gen kiểm soát tổn thương DNA.

Kết quả thu được là sự tăng (hay giảm) theo tỷ lệ của gen đích trong mẫu thí nghiệm tương quan với mẫu chuẩn và được chuẩn hóa theo sự biểu hiện của gen tham chiếu.

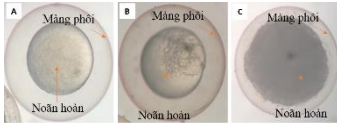
### **2.1.8. Phương pháp thống kê**

Các số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Sigmaplot 11.0 để so sánh sự khác biệt trên tất cả các chỉ tiêu thực hiện trên các nhóm khảo sát. Số liệu được trình bày ở dạng  $\bar{x} \pm SD$ . Các mẫu cá phân tích được lặp lại ba lần và đánh giá sự khác biệt giữa các nồng độ thực nghiệm bằng cách sử dụng ANOVA để thống kê giá trị trung bình và phương sai tương ứng. Sau khi so sánh bằng ANOVA, kết quả được coi là có giá trị khác biệt đáng kể khi  $P < 0,05$ .

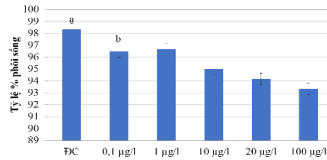
### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên tỷ lệ phát triển phôi cá ở các giai đoạn khác nhau

Trong quá trình nuôi và phôi cá ngựa vằn với tỷ lệ 2 cá cái và 1 cá đực trong bể nuôi ta thu được lượng phôi tốt, cấu trúc phôi trong suốt. Sau quá trình thu phôi thì phôi sẽ được nuôi trong môi trường nước có chứa chì ( $Pb^{2+}$ ) phù hợp ở các nồng độ 0,1 $\mu$ g/L, 1 $\mu$ g/L, 10 $\mu$ g/L, 20 $\mu$ g/L, 100 $\mu$ g/L. Mỗi lô thí nghiệm chứa 50 phôi cá và được lặp lại 3 lần với chu kỳ 14 giờ sáng và 10 giờ tối. Phôi chết được đếm và loại bỏ hàng ngày trong suốt quá trình quan sát.



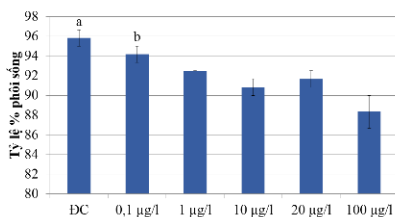
**Hình 3.1.** Hình thái của phôi cá ngựa vằn; A-bình thường; B, C-bất thường



**Hình 3.2.** Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn hình thành 26 đốt sống (22h).

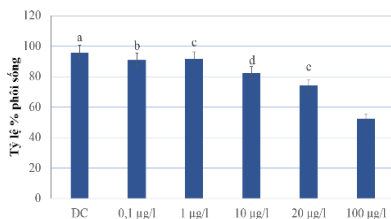
Kết quả phân tích tỷ lệ (%) phôi sống ở các giai đoạn có nồng độ chì ( $Pb^{2+}$ ) gây nhiễm. Dựa vào kết quả hình 3.2 ta có thể thấy, tỷ lệ phôi sống trung bình ở các lô thí nghiệm có xu hướng giảm theo sự tăng dần của nồng độ ( $Pb^{2+}$ ) thực nghiệm. Biến động từ 98,33% - 92,67% ( $P < 0,05$ ). Trong các nồng độ phát triển phôi cá ngựa vằn, tỷ lệ phôi sống ở các lô đối chứng cao hơn các lô thực nghiệm. Giai đoạn hình thành 26 đốt sống (22h): tỷ lệ phôi sống ở các nồng độ 0,1 $\mu$ g/L và 1 $\mu$ g/L giảm nhẹ so với lô đối chứng, giảm 1,83%-1,67% ( $P < 0,05$ ); tỷ lệ phôi sống ở nồng độ 10 $\mu$ g/L-100  $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm 3,33%-5%.

Giai đoạn hầu hống (48h): tỷ lệ phôi sống ở lô đối chứng là cao nhất (95,83%) và tỷ lệ phôi sống ở nồng độ nhiễm chì ( $Pb^{2+}$ ) 100 $\mu$ g/L là thấp nhất (88,33%), tỷ lệ phôi sống ở nồng độ 0,1 $\mu$ g/L và 1 $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm 1,67%-3,33% ( $P<0,05$ ), trong khi đó tỷ lệ phôi sống ở nồng độ 10 $\mu$ g/L và 20 $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm 5%-7,5% ( $P<0,05$ ).



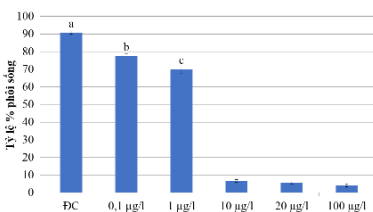
**Hình 3.3.** Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 48h

Giai đoạn thoát nang (72h): tỷ lệ phôi sống ở nồng độ 0,1 $\mu$ g/L-1 $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm nhẹ từ 4,17%-5%, tỷ lệ phôi sống ở các nồng độ 10 $\mu$ g/L-20 $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm 13,33%-21,67%, tỷ lệ phôi sống ở nồng độ 100 $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm 43,33% ( $P<0,05$ ).



**Hình 3.4.** Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 72h

Giai đoạn cuối cùng là giai đoạn tiêu noãn hoàng (168h) có sự thay đổi tỷ lệ phôi sống rõ ràng nhất: tỷ lệ phôi sống cao nhất ở lô đối chứng (90,83%), tỷ lệ phôi sống ở nồng độ 0,1 $\mu$ g/L và 1 $\mu$ g/L so với lô đối chứng giảm từ 13,33%-20,83% ( $P<0,05$ ), tỷ lệ

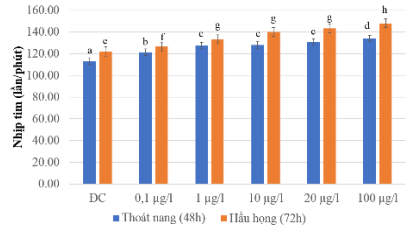


**Hình 3.5.** Thể hiện tỷ lệ % phôi sống giai đoạn 168h

phôi sống ở nồng độ  $10\mu\text{g/L}$ - $100\mu\text{g/L}$  so với lô đối chứng giảm mạnh từ 84,17%-86,67% ( $P < 0,05$ ) đạt ngưỡng gây chết LC50%.

### 3.2. Ảnh hưởng của chì ( $\text{Pb}^{2+}$ ) lên nhịp tim phôi cá ở các giai đoạn khác nhau

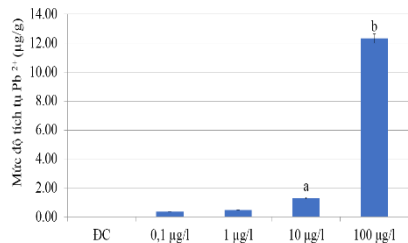
Ở giai đoạn thoát nang nhịp tim của phôi được gây nhiễm chì ( $\text{Pb}^{2+}$ ) ở các nồng độ 0,1, 1, 10, 20,  $100\mu\text{g/L}$  tăng dần từ  $8 \div 21$  nhịp/phút so với nhịp tim của phôi ở lô đối chứng ( $P \leq 0,05$ ). Đối với giai đoạn hầu hống nhịp tim của phôi ở nồng độ  $0,1\mu\text{g/L}$  tăng không đáng kể so với lô đối chứng, còn nhịp tim của các phôi ở các nồng độ 1, 10, 20,  $100\mu\text{g/L}$  so với lô đối chứng tăng lên từ  $11 \div 26$  nhịp/phút.



**Hình 3.6.** Biểu đồ thể hiện nhịp tim của phôi cá ngựa vằn tại các nồng độ chì ( $\text{Pb}^{2+}$ ) được thực nghiệm ở giai đoạn 48h và 72h.  $P < 0,05$

### 3.3. Xác định hàm lượng tích tụ chì ( $\text{Pb}^{2+}$ ) trong cơ quan phát triển của cá

Dựa vào kết quả có thể thấy, lượng  $\text{Pb}^{2+}$  tích tụ trong nội quan cá ngựa vằn ở nồng độ  $100\mu\text{g/L}$  chiếm tỷ lệ cao nhất ( $12,31\mu\text{g/g}$ ) và cao gấp 12,31 lần so với nồng độ  $10\mu\text{g/L}$ , gấp 25,12 lần so với nồng độ  $1\mu\text{g/L}$ , gấp 32,39 lần so với nồng độ  $0,1\mu\text{g/L}$ . Đối với lô đối chứng tỷ lệ là 0%, chứng tỏ lượng  $\text{Pb}^{2+}$  không tích tụ trong cơ thể cá.



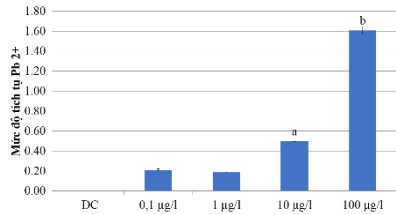
**Hình 3.7.** Lượng  $\text{Pb}^{2+}$  tích tụ trong nội quan cá ngựa vằn

Lượng  $Pb^{2+}$  tích tụ trong cơ và xương cá nưạ vằn thể hiện ở (Hình 3.8) cho thấy, nồng độ 100 $\mu\text{g/L}$  chiếm 2,22 $\mu\text{g/g}$  và cao gấp 3,1 lần so với nồng độ 10 $\mu\text{g/L}$ , gấp 8,2 lần so với nồng độ 1 $\mu\text{g/L}$  và nồng độ 0,1 $\mu\text{g/L}$ . Đối với lô đối chứng chưa nhận thấy sự hiện diện của chì ở nhóm đối chứng.

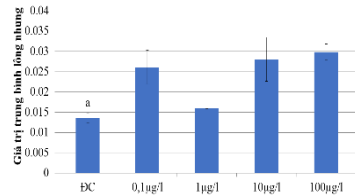
### 3.4. Ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên cấu trúc mô

Cấu trúc mô ruột của cá nưạ vằn có sự thay đổi các lông nhung tăng khi cá tiếp xúc với nồng độ  $Pb^{2+}$  cao trong ứng. Ở nồng độ 0,1 $\mu\text{g/L}$  đến 100 $\mu\text{g/L}$  đều tăng tỷ lệ lông nhung so với lô đối chứng và có sự khác biệt về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ), tuy nhiên sự chênh lệch không qua lớn giữa các nồng độ. Giá trị trung bình lông nhung ở nồng độ 10 $\mu\text{g/L}$ , 100 $\mu\text{g/L}$  gấp 2 lần so với lô đối chứng.

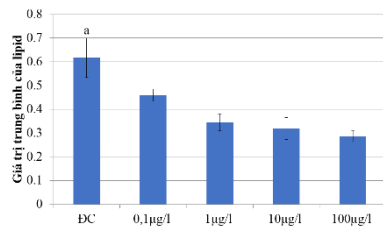
Cấu trúc mô buồng trứng của cá nưạ vằn có sự thay đổi khi cá tiếp xúc với nồng độ  $Pb^{2+}$  càng cao thì tỷ lệ các hạt lipid càng giảm. Ở nồng độ 0,1 $\mu\text{g/L}$  đến 100 $\mu\text{g/L}$  đều giảm tỷ lệ các hạt lipid so với lô đối chứng, có sự khác biệt về mặt



**Hình 3.8.** Lượng  $Pb^{2+}$  tích tụ trong cơ và xương cá nưạ vằn



**Hình 3.9.** Thể hiện sự ảnh hưởng của các nồng độ  $Pb^{2+}$  cảm ứng lên ruột



**Hình 3.10.** Thể hiện sự ảnh hưởng của các nồng độ  $Pb^{2+}$  cảm ứng lên buồng trứng



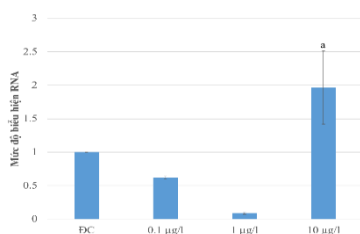
thống kê ( $P < 0,05$ ), tuy nhiên sự chênh lệch không qua lớn giữa các nồng độ. Nồng độ  $100\mu\text{g/L}$  giảm nhiều nhất, giảm 2,2 lần so với lô đối chứng, tiếp theo là nồng độ  $10\mu\text{g/L}$ , nồng độ  $1\mu\text{g/L}$ , nồng độ  $0,1\mu\text{g/L}$ . Điều đó chứng tỏ nồng độ ion chì tăng thì số lượng hạt lipid trong ruột giảm.

### 3.5. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện các gen đáp ứng với chì ( $\text{Pb}^{2+}$ ) và các gen kiểm soát tổn thương của cá ngừ vằn.

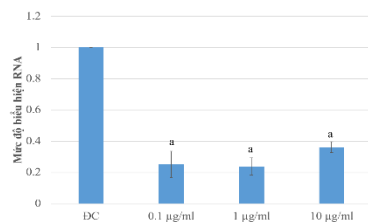
#### 3.5.1. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen *GADD45A* và kiểm soát tổn thương

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45A* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy tất cả các nồng độ thí nghiệm đều có sự thay đổi về mức độ biểu hiện gen, nhóm  $0,1\mu\text{g/L}$  và nhóm  $1\mu\text{g/L}$  mức độ biểu hiện gen giảm với nhóm đối chứng, nhóm  $0,1\mu\text{g/L}$  giảm gần 1,6 lần, nhóm  $1\mu\text{g/L}$  giảm 11 lần so với nhóm đối chứng. Nhưng nhóm  $10\mu\text{g/L}$  có sự tăng biểu hiện gen và tăng gấp 1,6 lần so với nhóm  $1\mu\text{g/L}$ .

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45A* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy tất cả các nhóm thí nghiệm đều có mức độ biểu



**Hình 3.11.** Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45A* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.



**Hình 3.12.** Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45A* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

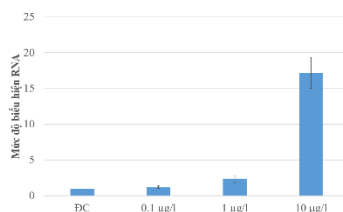
hiện gen giảm so với nhóm đối chứng, nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$  và nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 4 lần so với nhóm đối chứng, nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  giảm 3 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 $\mu\text{g/L}$  có sự tăng biểu hiện gen trở lại so với nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$  và nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  và tăng gấp 1,5 lần.

### 3.5.2. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen *GADD45G* và kiểm soát tổn thương

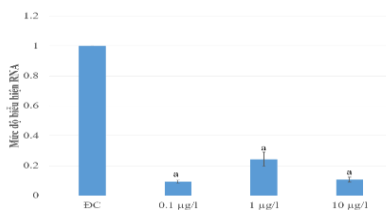
Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45G* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$ , 1 $\mu\text{g/L}$ , 10 $\mu\text{g/L}$  có mức độ biểu hiện gen tăng dần theo nồng độ càng cao dẫn đến mức độ biểu hiện gen thay đổi càng lớn, không thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng.

Nồng độ 1 $\mu\text{g/L}$  có sự tăng biểu hiện gen và tăng gấp 2,3 lần so với nhóm đối chứng. Ở nồng độ 10 $\mu\text{g/L}$  tăng mạnh biểu hiện gen và tăng gấp 17 lần so với các nhóm đối chứng.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *GADD45G* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$  và nhóm 10 $\mu\text{g/L}$  mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 10 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  lại có sự tăng biểu hiện gen so với nồng độ



**Hình 3.13.** Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45G* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.



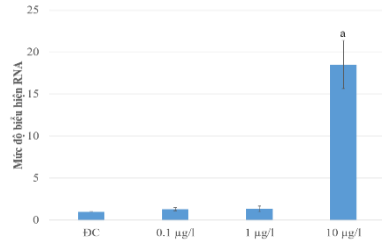
**Hình 3.14.** Sự thay đổi mRNA của gen *GADD45G* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

0,1 $\mu$ g/L và nhóm 10 $\mu$ g/L và tăng gấp 2,4 lần.

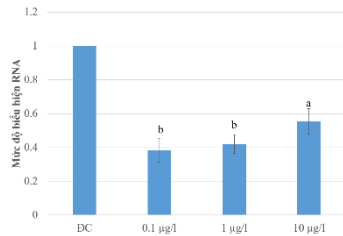
### 3.5.3. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen *SOD1* và kiểm soát tổn thương

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD1* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu$ g/L, 1 $\mu$ g/L và 10 $\mu$ g/L mức độ biểu hiện gen tăng so với nhóm đối chứng, nhóm 0,1 $\mu$ g/L, 1 $\mu$ g/L có mức độ biểu hiện gen tăng nhẹ so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 $\mu$ g/L lại bắt đầu có sự tăng biểu hiện gen và tăng hơn 14 lần so với các nhóm còn lại. Nguyên nhân có thể là do thời gian và nồng độ 0,1 $\mu$ g/L, 1 $\mu$ g/L chưa đủ làm thay đổi mức độ biểu hiện mRNA. Nồng độ 10 $\mu$ g/L đã bắt đầu có sự thay đổi mạnh so với nhóm đối chứng.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD1* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu$ g/L và 1 $\mu$ g/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 2,5 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 $\mu$ g/L có sự tăng biểu hiện gen so với nhóm 0,1 $\mu$ g/L và nhóm 1 $\mu$ g/L và tăng gấp 1,5 lần. Mức độ biểu hiện ở nhóm đối chứng gấp 2 lần so 10 $\mu$ g/L.



**Hình 3.15.** Sự thay đổi mRNA của gen *SOD1* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí

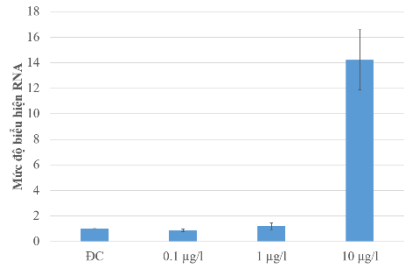


**Hình 3.16.** Sự thay đổi mRNA của gen *SOD1* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí

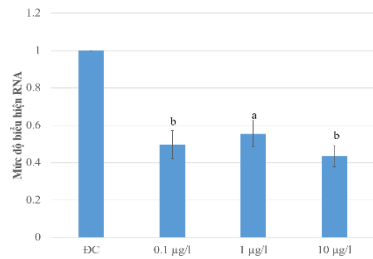
### 3.5.4. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen *SOD2* và kiểm soát tổn thương

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu$ g/L, 1 $\mu$ g/L có mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và tương đương so với nhóm đối chứng, nồng độ 0,1 $\mu$ g/L có sự giảm nhẹ so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 $\mu$ g/L lại có sự tăng biểu hiện gen và tăng gấp 14 lần so với nhóm đối chứng, nguyên nhân tăng có thể do chất ion chì ở nồng độ 10 $\mu$ g/L đã đủ liều lượng làm thay đổi gen *SOD2* trong giai đoạn 24h.

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *SOD2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu$ g/L, nhóm 1 $\mu$ g/L và nhóm 10 $\mu$ g/L mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm khoảng 2,3 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 1 $\mu$ g/L có mức biểu hiện gen cao so với nhóm 0,1 $\mu$ g/L và 10 $\mu$ g/L.



**Hình 3.17.** Sự thay đổi mRNA của gen *SOD2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.

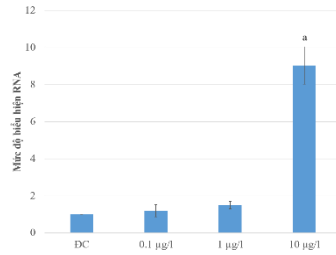


**Hình 3.18.** Sự thay đổi mRNA của gen *SOD2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

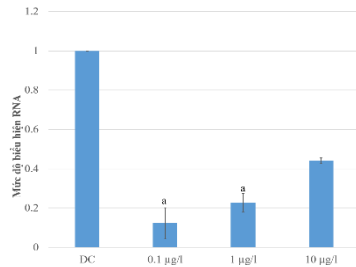
### 3.5.5. Đánh giá sự thay đổi biểu hiện gen *MT2* và kiểm soát tổn thương

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *MT2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy các nồng độ ion chì thí nghiệm đều gây ảnh hưởng đến gen *MT2* giai đoạn 24h, nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$  và nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  có mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau, không thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 $\mu\text{g/L}$  tăng mạnh biểu hiện gen và tăng gấp 9 lần so nhóm đối chứng và 8 lần so với nồng độ 0,1 $\mu\text{g/L}$ , 1 $\mu\text{g/L}$ .

Kết quả đánh giá real time RT-PCR của gen *MT2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm cho thấy: nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$  và nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  mức độ biểu hiện gen gần như giống nhau và giảm 5 lần so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, nhóm 10 $\mu\text{g/L}$  lại có sự tăng biểu hiện gen so với nhóm 0,1  $\mu\text{g/L}$  và nhóm 1 $\mu\text{g/L}$  và tăng gấp 2 lần. Ở nhóm 100 $\mu\text{g/L}$  mức độ biểu hiện gen tăng mạnh so với các nồng độ 0,1 $\mu\text{g/L}$ , 1 $\mu\text{g/L}$ , 10 $\mu\text{g/L}$  và tăng gấp 6,5 lần so với nhóm 0,1 $\mu\text{g/L}$  và 1 $\mu\text{g/L}$ , tăng gấp 3,2 lần so với nhóm 10 $\mu\text{g/L}$ .



**Hình 3.19.** Sự thay đổi mRNA của gen *MT2* giai đoạn 24h giữa các nhóm thí nghiệm.



**Hình 3.20.** Sự thay đổi mRNA của gen *MT2* giai đoạn 168h giữa các nhóm thí nghiệm.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. Kết luận

Luận án đánh giá được tác động của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên quá trình phát triển của các giai đoạn cá ngựa bao gồm tỷ lệ % phôi sống, sự thay đổi nhịp tim, xác định hàm lượng chì ( $Pb^{2+}$ ) trong cơ thể, đánh giá ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên mô ruột, buồng trứng, đánh giá sự thay đổi các gen và kiểm soát tổn thương *GADD45A*, *SOD1*, *SOD2*, *GADD45G*, *MT2*.

Chì ( $Pb^{2+}$ ) làm giảm tỷ lệ sống của phôi và ấu trùng cá ngựa vằn qua các giai đoạn phát triển theo sự tăng dần giữa các nồng độ khảo sát. Ngoài ra, chì ( $Pb^{2+}$ ) gây ra ảnh hưởng đến hoạt động sinh lí của cá: làm giảm tỷ lệ nở của phôi, ức chế quá trình phát triển của phôi và ấu trùng, gây ra dị tật cho cá như cong cột sống, phù màng tim, phù bụng, phù mắt, làm mất sắc tố của cá; nhịp tim cũng tăng theo sự tăng của từng nồng độ khảo sát.

Sự phơi nhiễm với chì ( $Pb^{2+}$ ) làm thay đổi sự biểu hiện mức phiên mã của các gen *GADD45A*, *GADD45G*, *SOD1*, *SOD2*, *MT2*. Real time RT-PCR đã cho thấy được sự sai lệch gen trong quá trình hấp thụ chì ( $Pb^{2+}$ ) của cá ngựa vằn ở giai đoạn 24h và 168h.

Sự tồn tại của chì ( $Pb^{2+}$ ) và tác động của nó đến con người và sinh vật là không thể lường trước. Khả năng hấp thụ bằng hệ thống hô hấp và tiêu hóa đã phân phối các chất độc hại trong tất cả các bộ phận của cơ thể, gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và sinh vật. Nghiên cứu này đã xác định sự có mặt của kim loại nặng và những tác động tiêu cực trong cơ thể cá ngựa vằn đã cho thấy mối đe dọa nghiêm trọng đối với sinh vật cũng như sức khỏe con người. Kết quả mà nghiên cứu này thu được sẽ là cơ sở để đóng góp cho những

ngiên cứu tiếp theo trong tương lai hướng đến cải thiện môi trường nhằm bảo vệ sức khỏe con người và sinh vật.

Hàm lượng chì ( $Pb^{2+}$ ) tích tụ trong toàn bộ cơ thể cá ngừ vẫn trường thành có chiều hướng tăng lên theo nồng độ gây nhiễm. Do đó cho thấy khả năng tích lũy sinh học của vi sinh vật trong sinh vật biển và mối đe dọa nghiêm trọng đối với hệ thủy sinh và sức khỏe con người.

## **2. Kiến nghị**

Tiếp tục có những đánh giá sâu hơn ảnh hưởng của chì thông qua biểu hiện của gen liên quan đến sự phát triển của phôi cá.

Đánh giá cấu trúc các cơ quan liên quan đến sự chuyển hóa của gan, thận.

## NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Nghiên cứu đầy đủ có hệ thống chì ( $Pb^{2+}$ ) ảnh hưởng đến một số đặc điểm sinh học trong giai đoạn phát triển của cá ngựa vằn. Lần đầu tiên có nghiên cứu ảnh hưởng chì ( $Pb^{2+}$ ) đến mức độ phân tử đến cá ngựa vằn.

Nghiên cứu này đóng góp mới về việc nghiên cứu tác động của chì ( $Pb^{2+}$ ) lên sự phát triển của cá ngựa vằn, một loài cá được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu sinh học. Nó cung cấp thông tin mới về các cơ chế phản ứng sinh học và ảnh hưởng của chì ( $Pb^{2+}$ ) đến các giai đoạn phát triển của cá và cung cấp cơ sở cho việc phát triển các phương pháp đánh giá rủi ro đối với sự phát triển của cá và các loài sinh vật khác trong môi trường bị ô nhiễm chì ( $Pb^{2+}$ ).



**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ**

1. Tuan Ngo Van, Thuan Tran Thi , Nga Nguyen Thi, Chi Nguyen Quynh Ho, Tram Le Ngoc Vo, Le Thanh Long, Thao Nguyen Thi Phuong, Effects of lead on structures of zebrafish intestine and oocytes, Ournal of Entomology and Zoology Studies, E - ISSN: 2320 – 7078, JEZS 2021, 9(2): 127 -129.
2. Tuan Van Ngo, Le Thi Lam, Cang Ngoc Ly, Tram Thi Bich Tran, Huy Nghĩa Quang Hoang, Chi Nguyen Quynh Ho, Mai Thi Phuong Nguyen, Thuan Tran Thi , Nga Nguyen Thi, Le Thanh Long, Thao Nguyen Thi Phuong. Effects of lead on the development of zebrafish embryo. European Journal of Molecular & Clinical Medicine, ISSN: 2515 -8260, V8, I3, 2021.