

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐẶNG NGUYỄN NHÃ KHANH

**NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÍCH LŨY, ĐÀO THẢI VÀ
ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb), CADIMI (Cd) ĐẾN LƯỢNG
GLYCOGEN, INSULIN, CORTISOL TRONG CÁ RÔ ĐỒNG
(*Anabas testudineus*)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

TP.HCM - Năm 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

ĐẶNG NGUYỄN NHÃ KHANH

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÍCH LŨY, ĐÀO THẢI VÀ
ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb), CADIMI (Cd) ĐẾN LƯỢNG
GLYCOGEN, INSULIN, CORTISOL TRONG CÁ RÔ ĐỒNG
(*Anabas testudineus*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa Vô cơ

Mã số: 9 44 01 13

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn
(Ký, ghi rõ họ tên)

PGS.TS. Nguyễn Thị Kim Phượng

TP.HCM – Năm 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "*Nghiên cứu quá trình tích lũy, đào thải và ảnh hưởng của chì (Pb), Cadimi (Cd) đến lượng glycogen, insulin, cortisol trong cá rô đồng (Anabas testudineus)*" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TP.HCM, ngày 29 tháng 09 năm 2025

Tác giả luận án

Đặng Nguyễn Nhã Khanh

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được thực hiện và hoàn thành tại Viện Địa lý tài nguyên TP.HCM (nay thuộc Viện Khoa học Sự sống), Viện Công nghệ Tiên tiến – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Học viện Khoa học và Công nghệ và trường Đại học Công nghiệp TP.HCM.

Đầu tiên, tác giả đặc biệt gửi lời cảm ơn chân thành và biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Nguyễn Thị Kim Phượng, người đã luôn cho tôi những lời khuyên chân thành, định hướng, hướng dẫn và giúp đỡ tận tình giúp tôi trưởng thành hơn trong kỹ năng nghiên cứu cũng như hoàn thành luận án của mình.

Bên cạnh đó, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Ban Lãnh đạo, các anh/chị thuộc phòng Đào tạo của Học viện Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ nhiệt tình giúp tôi hoàn thành khóa học cũng như hoàn thiện luận án này.

Tôi chân thành cảm ơn ThS. Ngô Thị Tường Vy, thành viên trong đơn vị đã hỗ trợ và giúp đỡ cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án này.

Chân thành cảm ơn các thành viên của phòng Vật liệu Y sinh – Viện Công nghệ Tiên tiến, các anh/chị thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học TP.HCM đã hỗ trợ tôi trong quá trình hoàn thiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình đã động viên, hỗ trợ và tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành chương trình học và luận án của mình.

TP.HCM, ngày 29 tháng 09 năm 2025

Tác giả luận án

Đặng Nguyễn Nhã Khanh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG BIỂU	vii
DANH MỤC HÌNH ẢNH.....	viii
MỞ ĐẦU	x
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	1
1.1. KHOA HỌC VỀ ĐỘC CHẤT HỌC MÔI TRƯỜNG	1
1.1.1. Phân loại thử nghiệm độc tính.....	1
1.1.2. Độc tính thủy sinh	2
1.1.3. Tích tụ sinh học và phóng đại sinh học	2
1.1.4. Sự xâm nhập và đường đi của độc tố trong cơ thể cá	3
<i>1.1.4.1. Sự xâm nhập của chất độc</i>	<i>3</i>
<i>1.1.4.2. Đường đi của chất độc trong cá sau khi xâm nhập</i>	<i>5</i>
1.2. TỔNG QUAN VỀ KIM LOẠI NẶNG (CHÌ, CADIMI) VÀ ĐỘC TÍNH	6
1.2.1. Chì (Pb)	7
<i>1.2.1.1. Đặc điểm và nguồn gây ô nhiễm chì.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.1.2. Tác động độc hại của Pb đối với cá</i>	<i>7</i>
<i>1.2.1.3. Tích tụ Pb trong cá</i>	<i>8</i>
1.2.2. Cadimi (Cd).....	9
<i>1.2.2.1. Đặc điểm và nguồn gây ô nhiễm Cd.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.2. Tác động độc hại của Cd đối với cá</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2.3. Tích tụ Cd trong cá</i>	<i>11</i>
1.3. THÀNH PHẦN SINH HÓA.....	11
1.3.1. Hormone cortisol.....	11
1.3.2. Hormone insulin	13
1.3.3. Glycogen.....	15

1.4. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÁ RÔ ĐỒNG	16
1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC	17
1.5.1. Tình hình nghiên cứu về tích lũy kim loại nặng trong nước	17
1.5.2. Tình hình nghiên cứu về tác động độc hại kim loại nặng trên thế giới..	21
1.5.3. Kết luận về những nghiên cứu tác động độc hại về kim loại nặng trong và ngoài nước	26
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	28
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	28
2.1.1. Cá rô đồng	28
2.1.2. Cortisol	28
2.1.3. Insulin	28
2.1.4. Glycogen.....	28
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	29
2.2.1. Nội dung nghiên cứu	29
2.2.2. Thiết kế thí nghiệm.....	29
2.2.2.1. Nghiên cứu độc cấp tính (LC_{50} trong 96 giờ) của Pb và Cd	29
2.2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn (sub-chronic) của Pb và Cd	30
2.2.3. Phương pháp phân tích hóa học	32
2.2.3.1. Phân tích hàm lượng cortisol	32
2.2.3.2. Phân tích hàm lượng insulin.....	33
2.2.3.3. Phân tích hàm lượng glycogen	34
2.2.3.4. Phân tích tổng hàm lượng Cd, Pb trong các mô cá.....	35
2.2.3.5. Giải phẫu mô học.....	37
2.2.3.6. Thẩm định các phương pháp phân tích	37
2.2.4. Phân tích thống kê	38
2.3. THIẾT BỊ - HÓA CHẤT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU.....	38
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	40
3.1. THẨM ĐỊNH CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH.....	40
3.1.1. Thẩm định phương pháp định lượng cortisol	40

3.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng insulin	41
3.1.3. Thẩm định phương pháp định lượng glycogen	43
3.1.4. Thẩm định phương pháp định lượng Pb và Cd tại mang, gan và thịt cá rô đồng	45
3.2. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb) ĐẾN CÁ RÔ ĐỒNG (<i>Anabas testudineus</i>)	47
3.2.1. Nghiên cứu ngưỡng độc cấp tính của Pb.....	47
3.2.1.1. Nồng độ Pb gây chết cá thí nghiệm trong 96 giờ	47
3.2.1.2. Ước tính ngưỡng độc cấp tính LC_{50} trong 96 giờ.....	47
3.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Pb đối với cá rô đồng.....	48
3.2.2.1. Cá rô đồng phơi nhiễm Pb.....	48
3.2.2.2. Cá rô đồng thôi nhiễm Pb.....	67
3.3. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CADIMI (Cd) ĐẾN CÁ RÔ ĐỒNG (<i>Anabas testudineus</i>)	71
3.3.1. Nghiên cứu ngưỡng độc cấp tính của Cd	71
3.3.1.1. Nồng độ Cd gây chết cá thí nghiệm trong 96 giờ	71
3.3.1.2. Ước ngưỡng độc cấp tính LC_{50} trong 96 giờ	71
3.3.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Cd đối với cá rô đồng	72
3.3.2.1. Cá rô đồng phơi nhiễm Cd.....	72
3.3.2.2. Cá rô đồng thôi nhiễm Cd.....	89
3.4. SO SÁNH TÁC ĐỘNG ĐỘC HẠI CỦA Pb VÀ Cd ĐỐI VỚI CÁ RÔ ĐỒNG (<i>Anabas testudineus</i>)	93
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	95
4.1. KẾT LUẬN.....	95
4.2. KIẾN NGHỊ.....	95
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	97
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	98
PHỤ LỤC	PL1

DANH MỤC VIẾT TẮT

<i>STT</i>	<i>Ký hiệu, từ viết tắt</i>	<i>Từ nguyên</i>	<i>Nghĩa tiếng Việt</i>
1	ACTH	Adrenocorticotrophic hormone	Hormone kích thích vỏ thượng thận
2	CRF	Corticotropin-releasing factor	Nhân tố giải phóng Corticotropin
3	CYP	Cytochrome P450	
4	DO	Dissolved oxygen	Oxy hòa tan
5	HPI	Hypothalamic – pituitary – interrenal axis	Trục hạ đồi – tuyến yên – tuyến liên thận
6	LC ₅₀	Median lethal concentration	Nồng độ gây chết trung bình
7	LD ₅₀	Median lethal dose	Liều lượng gây chết trung bình
8	LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level	Mức tác động bất lợi thấp nhất được quan sát thấy
9	LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
10	LOQ	Limit of Quantification	Giới hạn định lượng
11	MTs	Metallothioneins	
12	NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	Mức không quan sát thấy tác động bất lợi
13	NOEC	No Observed Effect Concentration	Nồng độ không quan sát thấy tác động
14	PP	Polypropylene	
15	ppm	parts per million	phần triệu
16	ppb	parts per billion	phần tỷ
17	ROS	Reactive Oxygen Species	Gốc oxy tự do
18	RSD	Relative Standard Deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
19	PL	Primary gill lamella	Phiến mang chính
20	SL	Secondary gill lamella	Phiến mang thứ cấp
21	EC	Endothelial cells	Tế bào nội mô

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Một số nghiên cứu về kim loại nặng trong nước.....	17
Bảng 1.2. Một số nghiên cứu tiêu biểu về tác động độc hại kim loại nặng đối với cá	21
Bảng 2.1. Trình tự phân tích glycogen bằng thuốc thử IKI	35
Bảng 2.2. Các thông số vận hành phân tích Cd và Pb	36
Bảng 2.3. Dung môi, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu.....	38
Bảng 2.4. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu.....	38
Bảng 3.1. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích Pb, Cd.....	45
Bảng 3.2. Các thông số của phương pháp phân tích.....	46
Bảng 3.3. Tỷ lệ về hàm lượng Pb tích lũy tại mang – gan, mang – thịt và gan – thịt	53

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Sự khác nhau giữa tích tụ sinh học và phóng đại sinh học	3
Hình 1.2. Cấu trúc mang cá từ mô đến cấp độ phân tử.....	5
Hình 1.3. Công thức cấu tạo của cortisol	12
Hình 1.4. Kích thích trục BSC và trục HPI để đáp ứng với căng thẳng ở cá	12
Hình 2.1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.....	30
Hình 2.2. Sơ đồ thời gian lấy mẫu để phân tích hóa học	31
Hình 2.3. Quy trình xử lý mẫu máu để phân tích hàm lượng cortisol	32
Hình 2.4. Sơ đồ xử lý mẫu máu để phân tích hàm lượng insulin	33
Hình 2.5. Sơ đồ xử lý mẫu gan cá để phân tích hàm lượng glycogen	34
Hình 2.6. Sơ đồ xử lý mẫu để phân tích tổng lượng Cd và Pb trên thiết bị ICP-OES	36
Hình 3.1. Sắc ký đồ của cortisol trong huyết tương.....	40
Hình 3.2. Đồ thị đường chuẩn cortisol.....	41
Hình 3.3. (a) Phổ hấp thụ của insulin và (b) Sắc ký đồ của insulin trong mẫu dịch chiết từ máu cá	42
Hình 3.4. Đồ thị đường chuẩn insulin.....	43
Hình 3.5. Bước sóng hấp thụ của glycogen-IKI	44
Hình 3.6. Đồ thị đường chuẩn glycogen	44
Hình 3.7. Tỷ lệ chết của cá rô đồng sau 96 giờ tiếp xúc với Pb	47
Hình 3.8. Ngưỡng độc cấp tính của Pb (LC ₅₀ 96 giờ) đối với cá rô đồng	48
Hình 3.9. Ảnh hưởng của Pb đến sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng.....	49
Hình 3.10. Tích lũy lượng Pb ở cá rô đồng tại mang, gan và thịt	51
Hình 3.11. Sự phân bố và tích lũy Pb tại mang, gan và thịt cá đối chứng và cá phơi nhiễm.....	55
Hình 3.12. Mang cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb	56
Hình 3.13. Ảnh mô học của mang cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb	56
Hình 3.14. Gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb.....	57
Hình 3.15. Ảnh mô học của gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb.....	57
Hình 3.16. (a) Sự thay đổi nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb; (b) Tỷ lệ giảm cortisol trong huyết tương cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Pb và (c) Tỷ lệ tăng cortisol trong huyết tương của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng	59
Hình 3.17. (a) Sự thay đổi nồng độ insulin trong máu cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb; (b) Tỷ lệ thay đổi insulin trong máu cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Pb và (c) Tỷ lệ giảm insulin trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng	62

Hình 3.18. (a) Sự thay đổi hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb; (b) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Pb và (c) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng	64
Hình 3.19. Sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng tại các thời điểm bắt đầu phơi nhiễm Pb, ngày thứ 28 phơi nhiễm và ngày thứ 14 thôi nhiễm ..	67
Hình 3.20. Hàm lượng Pb ở mang, gan và thịt của cá rô đồng (a) Lượng Pb được đào thải, (b) Lượng Pb tại mang, (c) Lượng Pb tại gan và (d) Lượng Pb tại thịt ở ngày thứ 28 của giai đoạn phơi nhiễm và ngày thứ 14 của giai đoạn thôi nhiễm.....	69
Hình 3.21. Tỷ lệ chết của cá rô đồng sau 96 giờ tiếp xúc với Cd	71
Hình 3.22. Ngưỡng độc cấp tính LC_{50} (96 giờ) đối với cá rô đồng	72
Hình 3.23. Ảnh hưởng của Cd đến sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng	73
Hình 3.24. Tích lũy Cd tại mang, gan và thịt cá rô đồng trong thời gian phơi nhiễm	75
Hình 3.25. Sự phân bố và tích lũy Cd trong cá rô đồng đối chứng và phơi nhiễm Cd	80
Hình 3.26. Gan cá đối chứng và gan cá tổn thương sau 28 ngày phơi nhiễm 10Cd.	81
Hình 3.27. Mô học của gan cá đối chứng và gan cá tổn thương sau 28 ngày phơi nhiễm 10Cd	81
Hình 3.28. (a) Sự thay đổi nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Cd; (b) Tỷ lệ thay đổi cortisol trong máu cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Cd và (c) Tỷ lệ tăng cortisol trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng	82
Hình 3.29. (a) Sự thay đổi nồng độ insulin trong máu cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Cd; (b) Tỷ lệ thay đổi insulin trong máu cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Cd và (c) Tỷ lệ giảm insulin trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng	85
Hình 3.30. (a) Sự thay đổi hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Cd; (b) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Cd và (c) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan của cá rô đồng phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng.....	87
Hình 3.31. Sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng tại các thời điểm bắt đầu phơi nhiễm và thôi nhiễm Cd, ngày thứ 28 phơi nhiễm và ngày thứ 14 thôi nhiễm.....	90
Hình 3.32. Hàm lượng Cd ở mang, gan và thịt của cá rô đồng (a) Lượng Cd được đào thải, (b) Lượng Cd tại mang, (c) Lượng Cd tại gan và (d) Lượng Cd tại thịt ở ngày thứ 28 của giai đoạn phơi nhiễm và ngày thứ 14 của giai đoạn thôi nhiễm	91

MỞ ĐẦU

Trong quá trình hiện đại hóa, công nghiệp hóa cùng với sự hình thành và phát triển của các khu chế xuất, khu công nghiệp và hàng trăm ngàn cơ sở hóa chất, chế biến trên toàn quốc thì vấn đề ô nhiễm môi trường ngày càng nặng nề hơn, đặc biệt là ô nhiễm kim loại nặng như chì, cadimi, crôm, niken, ... dẫn đến việc không chỉ có đất, nước, trầm tích hay không khí bị tác động mà hiện nay các loài thủy sinh (tôm, cá, các loài nhuyễn thể) không tránh khỏi những tác động này. Những kim loại nặng độc hại khi tồn tại vượt mức cho phép trong nước sẽ xâm nhập và tích tụ trong cơ thể các sinh vật thủy sinh gây rối loạn có khi còn phá vỡ các chức năng sinh lý bình thường (hô hấp, vận động và điều hòa trao đổi chất), làm suy yếu khả năng sinh sản và sự phát triển của chúng, ảnh hưởng đến sức đề kháng làm chúng dễ bị bệnh và tử vong. Đối với cá việc hấp thụ kim loại nặng từ môi trường sống sẽ thông qua các bộ phận như mang, da, hệ tiêu hóa và có thể tích lũy kim loại nặng này lại trong các cơ quan như mang, gan, thận và cơ. Việc tiêu thụ các sản phẩm cá bị ô nhiễm kim loại nặng có thể gây nên những nguy hiểm tiềm tàng như ung thư, giảm khả năng đề kháng và nhiều tác động tiêu cực khác đến người tiêu dùng, đặc biệt là đối với trẻ em và phụ nữ có thai.

Chì (Pb) và Cadimi (Cd) được xác định thuộc nhóm các kim loại nặng độc hại gây ra các vấn đề môi trường nghiêm trọng làm phá vỡ sự cân bằng của hệ sinh thái. Các kim loại nặng này không thể bị phân hủy sinh học mà chỉ tích tụ trong cơ thể sống và hầu hết được biết đến như là những chất tiềm ẩn gây ung thư. Do đó sự tích tụ sinh học và sự khuếch đại của các kim loại nặng độc hại này dọc theo chuỗi và lưới thức ăn sẽ gây ra những rủi ro về sức khỏe cho người tiêu thụ thực phẩm. Đối với cá, Pb và Cd có tác động xấu đến sự phát triển, hoạt động chuyển hóa trong gan, thận, cơ và các mô khác. Sự phân bố và tích tụ Pb, Cd giữa các bộ phận của cơ thể khác nhau (mang, đường ruột, gan, thận hay thịt) tùy thuộc vào nguồn ô nhiễm (thức ăn hoặc nước). Mặc dù, đã có nhiều nghiên cứu ghi nhận việc tích tụ Pb và Cd gây bất lợi cho sức khỏe cá, tuy nhiên, các tác động cụ thể của Pb và Cd đối với nhiều chức năng sinh lý vẫn chưa được tìm hiểu và nghiên cứu đầy đủ.

Cá đóng vai trò là chỉ thị sinh học quý giá để theo dõi hệ sinh thái thủy sinh nhờ khả năng chuyển hóa, giải độc và tích tụ kim loại nặng nhanh chóng trong cơ thể, chúng cũng rất nhạy cảm với những thay đổi nhỏ của môi trường, thêm vào đó cá lại là nguồn thức ăn quan trọng đặc biệt là đối với người dân Việt Nam. Do đó việc đánh giá tác động của kim loại nặng nói chung và Pb và Cd nói riêng lên cá là việc làm rất quan trọng. Ngoài ra, kết quả về sự tích tụ sinh học của Pb và Cd trong các mô khác nhau của cơ thể cá có thể được sử dụng làm chỉ số hiệu quả để đánh giá ô nhiễm Pb

và Cd trong nước. Khi cá gặp thay đổi trong môi trường sống (ô nhiễm, thay đổi nhiệt độ, ...) sẽ làm gia tăng căng thẳng, và khi bị căng thẳng vùng hạ đồi sẽ giải phóng ra những hormone kích thích các tế bào sản xuất cortisol. Khi hàm lượng cortisol tăng cơ thể cá cần sử dụng một lượng glucose nhiều hơn bình thường để đáp ứng những thay đổi này, điều này dẫn đến việc glycogen ở gan sẽ được huy động và phân giải gây nên thay đổi hàm lượng glycogen ở gan. Và khi hàm lượng glucose và glycogen bị rối loạn sẽ gây ảnh hưởng lên hormone insulin ở tuyến tụy. Do đó, việc xác định hàm lượng cortisol trong huyết tương, insulin trong máu và glycogen ở gan được xem như một công cụ quan trọng để đánh giá tác động sinh lý của ô nhiễm môi trường đến sức khỏe của cá. Bên cạnh đó các nghiên cứu về quá trình đào thải Pb và Cd rất quan trọng đối với việc bảo vệ sức khỏe, cho phép xác định khả năng tự làm sạch của cá cũng như các loài thủy sinh bị ô nhiễm kim loại.

Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) là loài cá vừa có giá trị dinh dưỡng, vừa có giá trị kinh tế cao đối với ngành nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam. Tuy nhiên, do chúng thường được nuôi trong ruộng lúa, ao hồ nước đọng (là những nơi dễ bị ô nhiễm kim loại nặng từ phân bón, thuốc trừ sâu, nước thải công nghiệp hay từ quá trình khai thác khoáng sản trong khu vực) nên chúng rất dễ hấp thu kim loại nặng. Mặc dù, cá rô đồng rất quan trọng ở Việt Nam, nhưng tương đối ít thông tin về tác động của Pb và Cd, đặc biệt là đối với sự tích tụ, đào thải và căng thẳng sinh lý. Vì vậy, đề tài “**Nghiên cứu quá trình tích lũy, đào thải và ảnh hưởng của Chì (Pb), Cadimi (Cd) đến lượng glycogen, insulin, cortisol trong cá rô đồng (*Anabas testudineus*)**” nhằm mục đích giải quyết các vấn đề sau:

- Tìm ra ngưỡng độc cấp tính (LC_{50} trong 96 giờ) của từng kim loại Pb và Cd đối với cá rô đồng.
- Tìm ra tác động độc hại của Pb và Cd đến sự thay đổi hàm lượng cortisol trong huyết tương, insulin trong máu và glycogen trong gan, đây là những dấu hiệu sinh học quan trọng để đánh giá mức độ căng thẳng sinh lý khi cá phải sống trong môi trường ô nhiễm kim loại nặng.
- Tìm ra quy luật tích tụ Pb và Cd trong các mô (gan, mang và thịt) của cá rô đồng. Ngoài ra, khả năng tự làm sạch của cá rô đồng đã phơi nhiễm Pb và Cd cũng được theo dõi dựa trên tỷ lệ đào thải của các kim loại này nhằm cung cấp thông tin cho các hoạt động nuôi cá, đảm bảo nguồn thực phẩm an toàn và giảm thiểu rủi ro cho sức khỏe của con người.

Nội dung nghiên cứu của luận án:

1. Nghiên cứu độc cấp tính trong 96 giờ (LC_{50} 96 giờ) của Pb và Cd đối với cá rô đồng (*Anabas testudineus*).

2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Pb, Cd đối với quá trình tích lũy và đào thải Pb, Cd ở mang, gan và thịt của cá rô đồng;

3. Tác động độc tính bán trường diễn của Pb, Cd đến sự thay đổi hàm lượng cortisol trong huyết tương, insulin trong máu và glycogen ở gan của cá rô đồng.

Ý nghĩa khoa học: Kết quả nghiên cứu của luận án sẽ thiết lập một nền tảng cho các nghiên cứu về sinh thái và độc chất môi trường bao gồm tác động của chất ô nhiễm lên cá rô đồng và việc sử dụng các dấu ấn sinh học để đánh giá tác động tiềm ẩn của các chất ô nhiễm đối với sức khỏe con người.

Ý nghĩa thực tiễn: Kết quả nghiên cứu của luận án có thể cung cấp cơ sở khoa học cho nhà quản lý trong việc định hướng sử dụng chuỗi thực phẩm theo hướng an toàn, đồng thời sử dụng các dấu hiệu sinh học như một công cụ hữu ích để giám sát ô nhiễm môi trường và cảnh báo những nguy cơ lan truyền kim loại nặng lên chuỗi thực phẩm.

Đóng góp mới

- Đã tìm được ngưỡng độc tính cấp của Pb và Cd đối với cá rô đồng, LC_{50} 96 giờ của Pb là 120 mg/L và Cd là 38 mg/L.

- Đã tìm được quy luật tích lũy Pb và Cd đối với cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm, trong đó, thứ tự tích lũy Pb là Mang >> Gan > Thịt và thứ tự tích lũy Cd là Gan >> Mang > Thịt.

- Đã tìm được quy luật đào thải Pb và đối với cá rô đồng sau 14 ngày sống trong nước sạch, trong đó, thứ tự đào thải Pb là Mang > Gan > Thịt và thứ tự đào thải Cd là Gan >> Mang > Thịt.

- Thông qua các biểu hiện rối loạn sản xuất cortisol, insulin và phân hủy glycogen gan đã tìm ra tác động của Pb và Cd đến hoạt động của trục hạ đồi – tuyến yên – tuyến liên thận (trục HPI), tuyến tụy và chức năng gan của cá rô đồng phơi nhiễm Pb và Cd.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. KHOA HỌC VỀ ĐỘC CHẤT HỌC MÔI TRƯỜNG

Độc chất học môi trường là một lĩnh vực khoa học đa ngành liên quan đến các nghiên cứu về các đặc tính của độc tố và đánh giá các mối nguy hại của nhiều tác nhân hóa học, sinh học và vật lý lên các sinh vật sống và hệ sinh thái cũng như phát triển các chiến lược để giảm thiểu và làm dịu những tác động này. Các nguồn chính gây ra chất độc trong môi trường thường là các hoạt động công nghiệp, nông nghiệp, giao thông vận tải, ... Tác động của những độc chất lên sinh vật thủy sinh có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm độc tính.

1.1.1. Phân loại thử nghiệm độc tính

Thử nghiệm độc tính rất đa dạng bao gồm các thử nghiệm độc cấp tính (acute), độc tính bán trường diễn (subchronic), độc tính trường diễn (chronic). Mục đích của thử nghiệm độc tính là để xác định các tác động có hại tiềm ẩn của một hóa chất hoặc sản phẩm đối với các chức năng sinh học trong cơ thể sinh vật, bao gồm các tác động gây chết và dưới mức gây chết [1-3].

Thử nghiệm độc cấp tính: Thời gian tiếp xúc ngắn, thường kéo dài từ 24 đến 96 giờ, chủ yếu tập trung vào các tác động tức thời và nghiêm trọng như tử vong (được đo bằng liều gây chết 50 % ký hiệu: LD₅₀ hoặc LC₅₀) và các dấu hiệu ngộ độc có thể quan sát được. Thử nghiệm này nhằm cung cấp thông tin ban đầu về mối nguy tiềm ẩn của một chất từ các lần tiếp xúc đơn lẻ hoặc ngắn.

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn: Tiếp xúc lặp đi lặp lại trong thời gian trung hạn, thường là từ 28 đến 90 ngày. Đây là giai đoạn nằm giữa độc cấp tính và độc trường diễn, được thiết kế để nhằm xác định các tác động độc hại tiềm ẩn có thể không rõ ràng trong các xét nghiệm cấp tính nhưng có thể trở nên đáng kể khi tiếp xúc nhiều lần. Nó điều tra các tác động độc hại phụ thuộc vào liều lượng, độc tính đối với cơ quan đích và khả năng đảo ngược của các tác dụng phụ.

Thử nghiệm độc tính trường diễn: Tập trung vào việc tiếp xúc kéo dài, thường kéo dài 12 tháng trở lên. Được thiết kế để đánh giá các tác động lâu dài và tích lũy của một chất bao gồm ung thư, độc tính sinh sản và độc tính phát triển. Nó cũng đánh giá các tác động không gây tử vong như giảm tăng trưởng hoặc sinh sản.

Điểm khác biệt chính giữa các loại thử nghiệm độc tính này nằm ở thời gian tiếp xúc. Các thử nghiệm độc cấp tính đánh giá các tác động tức thời, trong khi các thử nghiệm độc tính bán trường diễn và độc tính trường diễn cung cấp thông tin ngày càng toàn diện về các hậu quả tiềm ẩn lâu dài của việc tiếp xúc với chất độc hại.

1.1.2. Độc tính thủy sinh

Độc tính đối với thủy sinh được định nghĩa là nghiên cứu về tác động của một chất hóa học đối với các loài thủy sinh, thường được xác định trên các sinh vật đại diện cho ba bậc dinh dưỡng, tức là động vật có xương sống (cá), động vật không xương sống (giáp xác như Daphnia, tôm, cua, ...) và thực vật (tảo, thực vật thủy sinh, ...) [4, 5].

Đối với cá, thử nghiệm *độc cấp tính* của một chất là xác định nồng độ gây chết 50 % cá thí nghiệm (LC_{50}) trong 96 giờ, đây là phép đo tác động có hại tức thời của chất đó đối với cá. Các thử nghiệm này thường liên quan đến việc cho cá tiếp xúc với một loạt nồng độ chất và quan sát tỷ lệ tử vong của chúng trong khoảng thời gian 96 giờ. Giá trị LC_{50} càng thấp cho biết chất đó càng độc đối với cá, vì chỉ cần nồng độ nhỏ để giết chết 50 % quần thể thử nghiệm. Giá trị LC_{50} rất quan trọng trong đánh giá rủi ro môi trường đối với các loài thủy sinh và được sử dụng trong các quy định liên quan đến chất gây ô nhiễm nước mặt.

Các thử nghiệm *độc tính trường diễn* hay *độc tính bán trường diễn* (28 ngày) đối với cá là đo lường tác động của việc tiếp xúc lâu dài với nồng độ hóa chất thấp hơn so với nồng độ thử nghiệm cấp tính. Các thử nghiệm này tập trung vào các tác động dưới ngưỡng gây chết như sinh sản và tăng trưởng, ngoài mức độ gây chết. Phơi nhiễm lâu dài với các hóa chất có thể dẫn đến tác động bất lợi hoặc không bất lợi. Một số thuật ngữ được sử dụng trong thử nghiệm độc tính trường diễn:

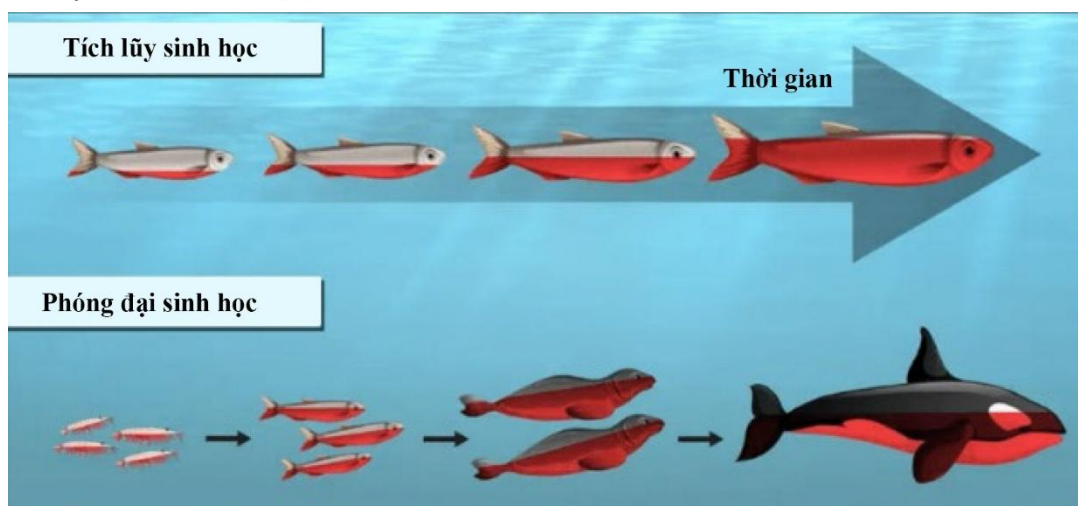
- NOEC (Nồng độ không quan sát thấy tác động): Nồng độ cao nhất của một chất trong thử nghiệm độc tính không cho thấy tác động có ý nghĩa thống kê nào đối với các sinh vật tiếp xúc so với nhóm đối chứng.
- NOAEL (Mức không quan sát thấy tác động bất lợi): Mức cao nhất của một chất hoặc tác nhân gây căng thẳng được đánh giá trong thử nghiệm không gây ra tác động bất lợi có ý nghĩa thống kê.
- LOAEL (Mức tác động bất lợi thấp nhất được quan sát thấy): Mức thấp nhất của một chất hoặc tác nhân gây căng thẳng được đánh giá trong thử nghiệm gây ra tác động bất lợi có ý nghĩa thống kê.

1.1.3. Tích tụ sinh học và phóng đại sinh học

Tích tụ sinh học (bioaccumulation) và phóng đại sinh học (biomagnification) đều là những quá trình mà độc tố tăng nồng độ trong cơ thể sinh vật, nhưng chúng khác nhau về phạm vi. Tích tụ sinh học đề cập đến sự tích tụ của một chất trong một cơ thể duy nhất theo thời gian, trong khi phóng đại sinh học là sự gia tăng nồng độ của một chất khi nó di chuyển lên chuỗi thức ăn thông qua các bậc dinh dưỡng khác nhau. Hình 1.1 trình bày sự khác nhau giữa tích tụ sinh học và phóng đại sinh học.

- Tích tụ sinh học xảy ra trong cơ thể sinh vật, trong đó nồng độ của một chất (chẳng hạn như độc tố) tích tụ trong các mô của cơ thể sinh vật theo thời gian. Sinh vật hấp thụ độc tố từ môi trường bên ngoài (nước, không khí, ...) nhanh hơn tốc độ chúng có thể đào thải, dẫn đến nồng độ trong cơ thể chúng tăng dần.

- Phóng đại sinh học xảy ra khi nồng độ của một chất ngày càng tăng trong các mô của các sinh vật ở các bậc dinh dưỡng cao hơn trong chuỗi thức ăn. Khi động vật ăn thịt tiêu thụ con mồi, nó không chỉ ăn vào các mô của con mồi mà còn ăn cả chất độc đã tích tụ trong các mô đó. Điều này thường xảy ra nếu chất độc dai dẳng, không dễ chuyển hóa hoặc bài tiết, nghĩa là nó không thể hoặc rất chậm bị phân hủy bởi các quá trình tự nhiên. Những chất độc dai dẳng này trở nên cô đặc hơn trong cơ thể động vật ăn thịt bởi vì chúng được chuyển lên chuỗi thức ăn nhanh hơn tốc độ chúng bị phân hủy hoặc bài tiết [6].



Hình 1.1. Sự khác nhau giữa tích tụ sinh học và phóng đại sinh học [6]

1.1.4. Sự xâm nhập và đường đi của độc tố trong cơ thể cá

1.1.4.1. Sự xâm nhập của chất độc

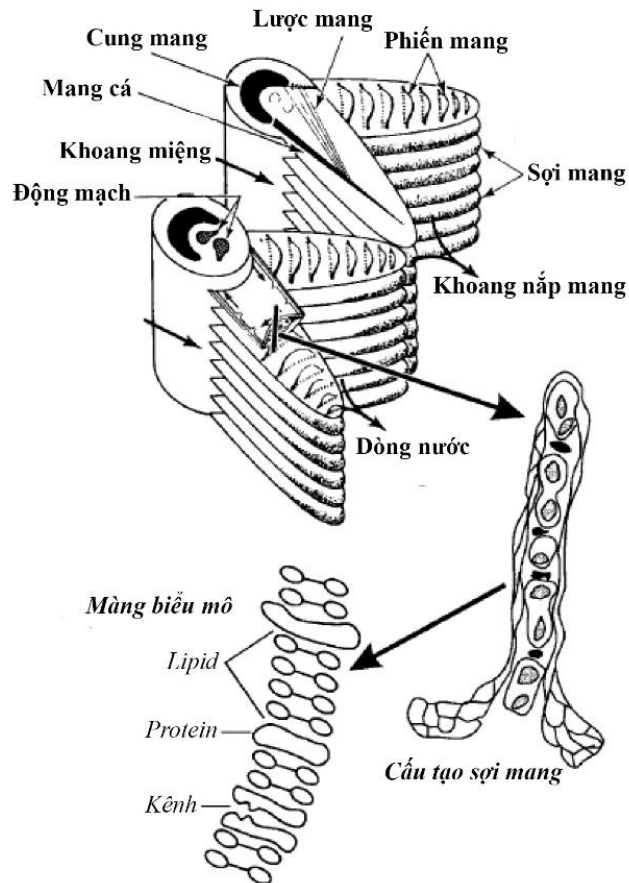
Các chất độc hại phổ biến có trong cá bao gồm kim loại nặng (thủy ngân, chì, cadimi, asen, ...), chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy (Polychlorinated biphenyl - PCB, dioxin, thuốc trừ sâu có clo, các vi nhựa, ...). Nguồn gốc của các chất độc này là từ chất thải công nghiệp và đô thị (chất thải từ các nhà máy, nhà máy xử lý nước thải, ...), nước thải nông nghiệp (phân bón và thuốc trừ sâu), lắng đọng trong khí quyển (đốt nhiên liệu hóa thạch), tai nạn hoặc xử lý các chất độc hại không đúng cách. Đáng chú ý là mức độ độc của các loại độc tố trong cá có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như loại độc tố, loài cá, độ tuổi của cá và vị trí mà độc tố đó tích tụ. Các chất độc có thể xâm nhập vào cá qua nhiều con đường khác nhau như xâm nhập qua mang, da và chuỗi thức ăn.

Xâm nhập qua mang: Trong quá trình cá hô hấp nước được đưa qua mang, nhờ sở hữu diện tích bề mặt lớn và màng mỏng nên mang cá có chức năng trao đổi khí giúp cá hấp thụ oxy từ nước và thải ra CO_2 . Do đó, trong quá trình hô hấp không những cá hấp thụ oxy hòa tan cần thiết cho hoạt động sống của cơ thể mà còn hấp thụ cả các hóa chất độc hại có trong nước, gồm kim loại nặng và các chất ô nhiễm khác.

Mang là bộ phận quan trọng của cá chịu trách nhiệm hô hấp để duy trì sự sống và điều chỉnh chất điện giải để các chất hòa tan đi vào thông qua con đường khuếch tán hoặc điều chỉnh ion. Mang cá hấp thụ oxy hiệu quả là do sở hữu cấu trúc chuyên biệt và cơ chế dòng chảy song song và ngược chiều. Cơ chế dòng chảy ngược là quá trình máu chảy qua các phiến mang theo hướng ngược lại so với dòng nước chảy qua mang. Cấu tạo mang cá được Hughes và Shelton mô tả như trên Hình 1.2.

Các bộ phận quan trọng của mang cá bao gồm cung mang, sợi mang và phiến mang. Cung mang giống như một khung xương hỗ trợ cấu trúc cho mang. Sợi mang là những cấu trúc mỏng, giống như sợi chỉ giúp tăng diện tích bề mặt trao đổi khí và mỗi sợi mang chứa một mạng lưới mao mạch. Phiến mang là những tấm dẹt nằm trên các sợi mang, giúp tối đa hóa diện tích bề mặt trao đổi khí. Các phiến mang là nơi trao đổi khí chính, nơi máu và nước tương tác. Sự kết hợp giữa diện tích bề mặt lớn (nhờ cấu trúc phức tạp của các sợi và phiến mang) và cơ chế dòng chảy ngược hiệu quả cho phép cá chiết xuất một tỷ lệ lớn oxy hòa tan từ nước và loại bỏ carbon dioxide, điều này đặc biệt quan trọng vì nước có nồng độ oxy thấp hơn so với không khí.

Bề mặt mang cá bao gồm tế bào biểu mô và lớp kép lipid. Tế bào biểu mô bao phủ bề mặt mang, kiểm soát chuyển động của các chất thông qua con đường gian bào (giữa các tế bào). Các tế bào này được nối với nhau bằng các mối nối chặt, có thể điều chỉnh chuyển động này. Viêm có thể ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của các mối nối chặt này, làm tăng tính thấm gian bào. Có nhiều loại tế bào biểu mô khác nhau, bao gồm các tế bào lát chịu trách nhiệm trao đổi khí, các tế bào clorua tham gia vào quá trình điều hòa thẩm thấu và tế bào nhầy [7]. Màng ngoài của các tế bào biểu mô được cấu tạo từ một lớp kép lipid. Lớp kép này cung cấp một rào cản có tính thẩm chọn lọc, kiểm soát sự di chuyển của các chất vào và ra khỏi tế bào. Thành phần của lớp kép lipid là phospholipid, glycolipid và cholesterol, đầu ưa nước của các lipid này chứa các bazơ nitơ. Các bazơ nitơ này ở đầu ưa nước của lipid hoạt động như các phối tử có thể liên kết các cation, đặc biệt là các kim loại vết. Các nghiên cứu về lớp kép lipid đã chỉ ra rằng các bazơ nitơ, như adenine và guanine, có thể tương tác với lõi kỵ nước của phospholipid và tạo điều kiện liên kết các cation. Cụ thể, các nguyên tử N7 và O6 của guanine là các vị trí liên kết cation đặc biệt hiệu quả [7].



Hình 1.2. Cấu trúc mang cá từ mô đến cấp độ phân tử
(Hughes và Shelton, 1962 [8])

Chất nhầy được tiết ra từ mang cá có hàm lượng glycoprotein phong phú và tạo thành một polyanionic có khả năng liên kết với một số kim loại vết. Ion hydro (H^+) và một số kim loại đã được chứng minh là cạnh tranh với ion canxi (Ca^{2+}) để giành các phối tử ở bề mặt mang. Do canxi có chức năng duy trì tính toàn vẹn của các mối nối tế bào trong biểu mô mang, và sự suy giảm của nó có thể làm tăng tính thấm với nước và chất điện giải.

Xâm nhập qua da: Mặc dù tầm quan trọng của con đường này khác nhau giữa các loài cá, tuy nhiên một số độc tố cũng có thể được hấp thụ trực tiếp qua da của cá sống trong nước bị ô nhiễm.

Xâm nhập qua chuỗi thức ăn: Cá có thể ăn phải chất độc bằng cách tiêu thụ các sinh vật nhỏ hơn đã tích tụ các chất độc đó. Sinh vật nhỏ hơn bao gồm vi khuẩn chuyển hóa thủy ngân, sinh vật phù du tiêu thụ vi khuẩn bị ô nhiễm, sinh vật sống ở đáy trong trầm tích bị ô nhiễm hay cá nhỏ hơn đã tiêu thụ con mồi bị ô nhiễm.

1.1.4.2. Đường đi của chất độc trong cá sau khi xâm nhập

Sau khi xâm nhập vào cơ thể, độc tố trong cá đi theo một con đường bao gồm phân phối, chuyển hóa sinh học và đào thải, với sự tích tụ đáng kể trong các mô và

cơ quan cụ thể. Sự thành công của quá trình giải độc phụ thuộc vào khả năng chuyển hóa và bài tiết độc tố hiệu quả của cá.

a. Vận chuyển, phân phối và tích tụ: Qua hệ thống máu và bạch huyết, các độc tố được vận chuyển khắp cơ thể đến các cơ quan khác nhau như gan, thận và cơ. Các độc tố như PCB, DDT, dioxin và kim loại nặng là những chất tồn tại dai dẳng và không dễ đào thải sẽ tích tụ sinh học trong các mô như cơ, mỡ và các cơ quan nội tạng. Các nghiên cứu cho thấy thủy ngân tích tụ trong mang, ruột và não trong khi asen vô cơ tích tụ nhiều trong gan [9]. Chì ưu tiên liên kết với các mô giàu canxi như xương và mang trong khi Cadimi tích tụ chủ yếu ở gan và thận [10]. Kim loại nặng có thể tích tụ trong mô cá ở mức cao hơn nồng độ trong môi trường. Tích tụ kim loại nặng có thể dẫn đến nhiều tác động tiêu cực khác nhau đến sức khỏe của cá, bao gồm tổn thương nội tạng, suy giảm khả năng sinh sản và thay đổi hành vi.

b. Giải độc và đào thải: Ở cá, quá trình giải độc và quá trình đào thải là những quá trình quan trọng liên quan đến nhiều cơ quan hoạt động cùng nhau để loại bỏ các độc tố và chất thải. Các cơ quan chính tham gia vào quá trình giải độc và đào thải là mang, thận và gan.

- Gan của cá là cơ quan giải độc chính của cá, cơ chế giải độc ở gan chủ yếu liên quan đến chuyển hóa sinh học. Trong quá trình chuyển hóa sinh học một số độc tố có thể được chuyển đổi thành các chất trung gian ít độc hại hơn, dễ hòa tan trong nước hơn và có thể dễ dàng bài tiết hơn. Quá trình chuyển hóa sinh học của asen vô cơ thành arsenobetaine được coi là một cách để loại bỏ độc tính của asen trong gan cá [11]. Ngoài ra, cá có thể tổng hợp metallothioneins (MTs), một loại protein liên kết kim loại có thể cô lập các kim loại nặng như cadimi, làm giảm độc tính của chúng. Được biết, nhiều loại enzyme trong gan có thể chuyển hóa độc tố thông qua các quá trình như oxy hóa, khử, thủy phân và liên hợp. Đầu tiên, các enzyme như cytochrome P450 (CYP) thực hiện các phản ứng oxy hóa, khử và thủy phân để đưa các nhóm chức năng vào các độc tố từ đó tăng độ hòa tan trong nước [12]. Tiếp theo, các chất chuyển hóa ở giai đoạn đầu hoặc độc tố ban đầu được liên hợp với các phân tử nội sinh như acid glucuronic, glutathione hoặc sulfat. Sự liên hợp này làm tăng thêm độ hòa tan trong nước của các độc tố, giúp dễ bài tiết hơn [13].

- Cá có thể đào thải các độc tố đã chuyển hóa thông qua mang hoặc thận. Tuy nhiên, hiệu quả đào thải qua mang hoặc thận có thể khác nhau tùy thuộc vào tính chất của độc tố và loài cá.

1.2. TỔNG QUAN VỀ KIM LOẠI NẶNG (CHÌ, CADIMI) VÀ ĐỘC TÍNH

Các loại kim loại nặng phổ biến hoặc được biết đến nhiều nhất bao gồm chì, cadimi, asen, đồng, kẽm, niken, crom và nhôm. Tất cả các loại này đều gây ra những

rủi ro nhất định đối với sức khỏe các sinh vật sống và môi trường. Bởi vì không thể phân hủy sinh học và sở hữu đặc tính tích tụ sinh học do đó nồng độ của kim loại nặng trong môi trường tăng đều đặn và tích tụ trong cơ thể sinh vật [14]. Cá là loài đứng đầu chuỗi thức ăn dưới nước phù hợp cho các nghiên cứu về độc tính và độc tố di truyền. Chúng cực kỳ nhạy cảm với sự thay đổi về môi trường, điều này khiến chúng trở thành các chỉ thị sinh học phù hợp để theo dõi các hệ sinh thái dưới nước, vì chúng chuyển hóa, giải độc và tích tụ hiệu quả các kim loại độc hại trong cơ thể. Khi kim loại độc có thể xâm nhập vào cơ thể cá thông qua quá trình ăn uống, hấp thụ nước để hô hấp hoặc trao đổi ion qua màng bán thấm tại mang, dẫn đến sự tích tụ của chúng trong nhiều mô khác nhau trên khắp cơ thể [15]. Các tác động độc hại của kim loại nặng đối với cá là đa hướng và biểu hiện bằng nhiều thay đổi trong các quá trình sinh lý và hóa học của hệ thống cơ thể chúng [14, 16]. Kim loại được phân loại thành các nguyên tố vi lượng thiết yếu và không thiết yếu dựa trên vai trò của chúng trong quá trình trao đổi chất của sinh vật. Chì và Cadimi là hai trong bốn kim loại không thiết yếu và độc hại nhất đối với môi trường ngay cả ở nồng độ thấp [17].

1.2.1. Chì (Pb)

1.2.1.1. Đặc điểm và nguồn gây ô nhiễm chì

Pb là kim loại thuộc nhóm IVB của bảng tuần hoàn, rất nặng, mềm, dễ uốn và có màu xám xanh. Kim loại này có khối lượng nguyên tử là 207, điểm nóng chảy là 327°C và điểm sôi là 620°C [8]. Pb là một thành phần tự nhiên của lớp vỏ trái đất và thường được tìm thấy ở dạng vết, trong nước mặt hàm lượng Pb được ước tính là 0,02 µg/L và hiếm khi vượt quá vài µg/L. Mặc dù Pb có mặt ở khắp mọi nơi trong môi trường nước nhưng mức độ ô nhiễm Pb cao chủ yếu đến từ các hoạt động của con người [14, 18].

Nhờ có sự kết hợp giữa các tính chất vật lý và hóa học nên Pb cực kỳ hữu ích trong công nghiệp [14]. Các nguồn gây ô nhiễm Pb bao gồm công nghiệp khai thác Pb, nhà máy mạ và luyện kim, nhà máy sản xuất pin, sản xuất vũ khí, sản xuất sơn, hoạt động đánh bắt cá, hóa chất nông nghiệp và cơ sở hạ tầng Pb cũ như hệ thống ống nước và sơn cũ [14, 19].

1.2.1.2. Tác động độc hại của Pb đối với cá

Pb là nguyên tố không thiết yếu và không có vai trò trao đổi chất trong các cộng đồng sinh vật của chu trình sinh thái. Pb được tìm thấy trong mô cơ của cá ở những khu vực có nhiều hoạt động nông nghiệp, công nghiệp và nước thải đô thị chưa qua xử lý [19]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, nồng độ Pb gây chết cá là 10 – 100 mg/L và cá sẽ có những thay đổi về hành vi, chậm phát triển khi tiếp xúc với Pb ở nồng độ dưới ngưỡng gây chết [16]. Tác động độc hại của Pb đối với cá là rất đa dạng như

biến đổi mô học bao gồm dấu hiệu hoại tử tế bào nhu mô, xẹp mạch máu, xơ hóa dây gan và mô liên kết, mất khả năng tăng trưởng và trọng lượng cơ thể cũng được tìm thấy ở cá tiếp xúc với Pb [16]. Pb gây tổn thương hệ thần kinh trung ương, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thống tạo máu, hệ thống tim mạch và các cơ quan như gan, thận. Ion Pb^{2+} kích thích calmodulin để giải phóng các chất dẫn truyền thần kinh trong tế bào thần kinh [20]. Calmodulin là một protein liên kết canxi phổ biến được tìm thấy trong tất cả các tế bào nhân chuẩn. Canxi một ion quan trọng để giải phóng và điều hòa chất dẫn truyền thần kinh, Pb cạnh tranh với canxi bằng cách liên kết với hệ thống vận chuyển canxi của hệ thần kinh, từ đó gây ra ảnh hưởng đến quá trình dẫn truyền thần kinh [18]. Hành vi tăng động nghiêm trọng kèm theo thở gấp ở cá cũng được báo cáo là do tổn thương thần kinh bởi Pb và tiếp xúc lâu dài với Pb gây độc cho hệ thần kinh trung ương, cũng gây tổn thương não, dẫn đến rối loạn chức năng nhận thức và hành vi. Rice và cộng sự (2011) đã báo cáo rằng vận tốc quay đầu và thời gian bơi ở cá ngựa vằn tiếp xúc với Pb giảm khi nồng độ Pb tăng và số lượng cá ngựa vằn không có phản ứng giật mình cũng tăng [21]. Pb cũng gây ra tình trạng hạ canxi máu bằng cách can thiệp vào hoạt động của các tế bào ion trong biểu mô mang cá. Ái lực cao của Pb với Ca^{2+} ATPase, chất trao đổi Na^{+}/Ca^{2+} và Na^{+}/K^{+} ATPase cao đã gây phá vỡ gradient điện hóa và điều hòa ion, phơi nhiễm Pb lâu dài cũng gây ra rối loạn điều hòa ion ảnh hưởng đến cân bằng Ca^{2+} , K^{+} và Na^{+} [18].

Ngoài ra, Pb cũng làm mất cân bằng giữa các chất oxy hóa và chất chống oxy hóa, gây ra căng thẳng oxy hóa và ngộ độc Pb [18]. Căng thẳng oxy hóa xảy ra là do sự mất cân bằng giữa quá trình tạo ra chất oxy hóa và chất chống oxy hóa. Nhiều nghiên cứu *in vivo* đã chỉ ra rằng việc tiếp xúc với Pb có thể gây ra sự gia tăng các gốc oxy tự do (ROS) như hydrogen peroxide, gốc superoxide và gốc hydroxyl. Hydrogen peroxide được chuyển đổi thành gốc hydroxyl thông qua phản ứng Fenton gây tổn thương protein, tổn thương DNA/RNA và peroxy hóa lipid [18].

1.2.1.3. Tích tụ Pb trong cá

Pb không chỉ tác động đến khả năng vận động ở cá mà còn tích tụ sinh học, chủ yếu ảnh hưởng đến gan, lá lách, thận và mang. Pb là một trong những kim loại độc tích tụ nhiều nhất do đặc tính dễ liên kết với các nguyên tử oxy và lưu huỳnh trong protein để tạo thành một phức hợp ổn định [18]. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận thức ăn chứa Pb gây ra sự tích tụ đáng kể trong các mô cụ thể như thận, gan, lá lách, ruột và mang cá mú đá non (*Sebastes schlegelii*) và cá bơn sao (*Platichthys stellatus*). Ở cá bơn sao ngoại trừ não và cơ ít bị ảnh hưởng, còn lại các mô khác đều có sự tích lũy Pb (60 mg/kg) sau 04 tuần phơi nhiễm lần lượt là ruột > thận > gan > lách = mang > cơ > não. Sau 02 tuần phơi nhiễm, hàm lượng glucose ở nhóm cá đã từng phơi nhiễm

Pb 60 mg/kg và lượng protein tổng số ở nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 120 mg/kg phục hồi về mức ban đầu. Tỷ lệ hồi phục cao nhất được ghi nhận ở não (85,0 %) và thấp nhất ở mang (49,1 %). Với cá mú đá non sau 04 tuần phơi nhiễm Pb qua khẩu phần ăn thì sự tích lũy Pb ở các mô lần lượt là thận > gan > lách > ruột > mang > cơ. Khi hàm lượng Pb từ 60 mg/kg thì số lượng hồng cầu (RBC), giá trị hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), protein tổng số đều giảm trong khi hàm lượng glucose, cholesterol, GOT (glutamic oxalate transminase) và GPT (glutamic pyruvate transminase) lại tăng [22, 23]. Theo Kim và Kang (2014), kim loại tích tụ tương đối cao tại mang cá nước ngọt, điều này là do cá nước ngọt chủ động vận chuyển các ion kim loại qua các tế bào ion trong mang để duy trì các ion trong cơ thể [24]. Gan và thận cũng là các mô mục tiêu của Pb và việc tiếp xúc lâu dài với Pb gây ra sự tích tụ cao trong các mô này. Sự tích tụ Pb cao nhất trong gan và thận đối với cá tiếp xúc với lâu dài với Pb có thể là do chức năng giải độc và loại bỏ các chất độc của các cơ quan này [18]. Sự tích tụ Pb trong cơ được báo cáo là rất thấp so với các mô khác. Sự tích tụ trong các mô cơ (thịt) của cá là một chỉ số rất quan trọng về an toàn thực phẩm, vì đây là mô mà con người thường xuyên ăn vào nhất. Sự tích tụ Pb trong cơ được báo cáo là rất thấp so với các mô khác. Nhìn chung, sự tích tụ Pb cao hơn đã được quan sát thấy ở các cơ quan hoạt động trao đổi chất nhiều hơn [18].

1.2.2. Cadimi (Cd)

1.2.2.1. Đặc điểm và nguồn gây ô nhiễm Cd

Cd là một nguyên tố độc sinh học và không thiết yếu, thuộc nhóm IIB của bảng tuần hoàn với khối lượng nguyên tử là 112, nhiệt độ nóng chảy là 321°C và nhiệt độ sôi là 767°C. Cd là một nguyên tố tinh khiết mềm có hoạt động vừa phải. Các hợp chất của Cd nhìn chung là rất độc hại, trong đó oxit cadimi độc hại hơn cadmium sulfua [19].

Vỏ Trái Đất rất giàu Cd, thường được tìm thấy kết hợp với quặng đồng, kẽm và chì [25]. Nồng độ Cd trong nước biển là từ 5 đến 110 mg/L [26]. Trong nước mặt và nước ngầm, nồng độ Cd rất thấp < 1,0 µg/L, tuy nhiên ở vùng nước mặt bị ô nhiễm nồng độ Cd có thể tăng lên tới từ 2,0 đến 3,0 µg/L hoặc cao hơn [17]. Nguồn gây ô nhiễm Cd bao gồm mạ điện, khai thác, ổn định nhựa, hợp kim, xi măng, chất tạo màu, sản xuất pin, việc đốt nhiên liệu hóa thạch, phân bón có hàm lượng phosphate cao, bùn thải đô thị và nước thải [25]. Một số quá trình tự nhiên bao gồm phong hóa đá, phun trào núi lửa, bụi gió, cháy rừng và xói mòn là những yếu tố chính góp phần gây ô nhiễm Cd môi trường. Theo báo cáo của Chương trình Môi trường Liên hợp quốc (UNEP), lượng Cd thải ra môi trường hàng năm là từ 150 đến 2600 tấn [25].

1.2.2.2. Tác động độc hại của Cd đối với cá

Tác động độc hại của Cd đối với cá có thể xuất hiện theo nhiều cách khác nhau bao gồm sự phát triển phôi cá, điều hòa cân bằng ion, chuyển hóa năng lượng, tăng trưởng, phản ứng với căng thẳng và khả năng miễn dịch.

Cd đã gây rối loạn chức năng của một số cơ quan quan trọng (mang, gan và thận), ảnh hưởng đến sinh lý và cản trở sự phát triển của cá [15]. Ngoài ra, Cd làm thay đổi các chỉ số huyết học bằng cách làm rối loạn quá trình chuyển hóa sắt và tạo ra tình trạng thiếu máu. Cd gây ức chế các enzym chống oxy hóa, gây ra quá trình peroxy hóa lipid ở động vật. Tác động gây hại của Cd lên khả năng sinh sản của cá cũng đã được báo cáo [16]. Cá gặp khó khăn trong quá trình sinh sản do hình dạng trứng bất thường, nang trứng không đầy, co rút, ngưng tụ tế bào chất, và chỉ số sinh dục thấp hơn. Ngoài ra các tác động xấu khác của Cd như co thắt các tiểu thụ tinh trong tinh hoàn, gây xơ hóa ở tinh hoàn, giảm khả năng vận động và sức sống của tinh trùng, ... [15, 16].

Ở nồng độ thấp, Cd làm suy yếu các chức năng sinh hóa, sinh lý, rối loạn điều hòa thẩm thấu và ion, tổn thương tế bào và thay đổi hoạt động của enzym ở cá. Tiếp xúc lâu dài với Cd, chức năng của thận và gan có thể bị rối loạn, dẫn đến ức chế tăng trưởng, căng thẳng oxy hóa, tổn thương miễn dịch và thậm chí tử vong [27]. Mặt khác, Cd có thể ảnh hưởng đến các tín hiệu trục hạ đồi – tuyến yên – liên thận (HPI) ở cá, dẫn đến rối loạn nội tiết [17]. Phơi nhiễm với Cd có thể gây rối loạn thẩm thấu đối với cá nước mặn, do cá liên tục tiêu thụ nước biển để duy trì cân bằng nội môi ở độ thẩm thấu cao trong môi trường. Đối với cá nước ngọt, phơi nhiễm Cd có thể gây ra ức chế sự hấp thụ canxi tại mang [28].

Ngoài ra, Cd cũng liên kết với MTs để tạo thành phức Cd-MTs. Phức này tồn tại một thời gian dài trong cơ thể dẫn đến tổn thương và rối loạn chức năng của các bộ phận trong cơ thể [26]. Là một kim loại không có tính oxy hóa khử, Cd có thể trực tiếp tạo ra ROS hoặc gián tiếp bằng cách tăng tính khả dụng của Fe tự do (một kim loại có hoạt tính oxy hóa khử), gây ra căng thẳng oxy hóa thông qua phản ứng Fenton [26]. Ngoài ra, Cd cũng gây dịch chuyển Cu khỏi vị trí liên kết, làm tăng khả năng phân ly H_2O_2 qua phản ứng Fenton. Cd có thể cản trở các enzyme sulfhydryl và tương tác với các phối tử tế bào khác, do đó phá vỡ các con đường phosphoryl hóa oxy hóa. Mặt khác, Cd có thể gây suy yếu chức năng tế bào và cân bằng nội môi bằng cách can thiệp vào các quá trình vận chuyển qua màng tế bào và biểu mô. Cd cũng có thể gây ra biểu hiện gen mục tiêu bằng cách kích hoạt protein kinase tế bào và phosphoryl hóa nhiều yếu tố phiên mã [26].

1.2.2.3. Tích tụ Cd trong cá

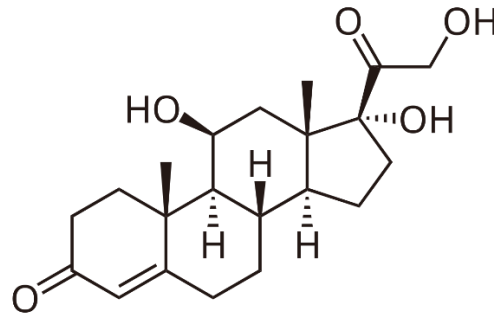
Sự tích tụ sinh học của Cd trong cá bị ảnh hưởng bởi dạng hóa học của Cd trong nước như phức hợp hoặc các ion vô cơ hòa tan. Cd trong nước khuếch tán thụ động vào cơ thể cá và đến các tế bào bên trong mang thông qua chất vận chuyển kim loại hóa trị hai và kênh Ca^{2+} biểu mô nằm trong biểu mô mang. Bởi vì Cd có kích thước và điện tích tương tự như canxi (Ca^{2+}) nên Cd có thể bắt chước canxi và sử dụng các kênh này để đi vào trong tế bào mang. Tích tụ sinh học của các ion Cd tại mang cao là do liên kết không đặc hiệu giữa Cd với mucopolysaccharides (một loại glycoprotein) thành phần của mucoprotein có bên ngoài mang [17]. Cd ra khỏi tế bào mang qua kênh Ca^{2+} -ATPase ái lực cao và kênh trao đổi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Trong máu, Cd liên kết với các protein vận chuyển như albumin và metallothionein (một loại protein giàu cysteine có ái lực cao với kim loại nặng) đến các mô khác như gan, xương hoặc thận để lưu trữ và giải độc kim loại. Cd tích tụ sinh học trong ruột nhờ liên hợp với cysteine hoặc oligopeptide chứa cysteine. Sự tích tụ Cd trong ruột có thể thấy rõ hơn đối với các sống trong môi trường có độ mặn cao (nước lợ và nước biển) [17]. Tiếp xúc với Cd liều thấp cũng kích hoạt sự gia tăng quá trình tổng hợp metallothionein trong gan, điều này xảy ra vì Cd khởi tạo sự gia tăng hàm lượng mRNA metallothionein trong tế bào gan. Sự liên kết giữa metallothionein với các ion cadimi đã cô lập hiệu quả Cd, ngăn không cho nó tương tác với các thành phần thiết yếu khác của tế bào [29]. Tích tụ Cd trong lá lách tương đối thấp điều này có thể là do khả năng loại bỏ kim loại của lá lách. Cá có xu hướng tích tụ Cd trong các mô hoạt động trao đổi chất chính như gan, thận, lá lách và mang [17]. Tích tụ Cd trong cơ (thịt) thấp hơn nhiều so với các bộ phận khác, điều này có ý nghĩa quan trọng vì con người chủ yếu ăn thịt cá chứ không phải các cơ quan.

1.3. THÀNH PHẦN SINH HÓA

Cortisol, insulin và glycogen là những tác nhân chính trong sinh hóa, liên quan cụ thể đến cách các sinh vật sống quản lý và sử dụng năng lượng.

1.3.1. Hormone cortisol

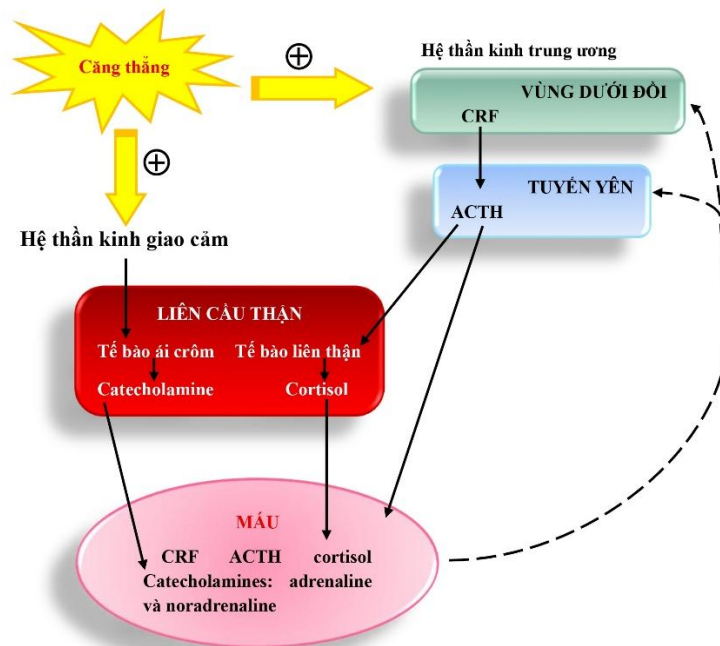
Cortisol là một loại hormone steroid đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh quá trình trao đổi chất, bao gồm phản ứng với những căng thẳng và khả năng cung cấp glucose. Công thức phân tử của cortisol là $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$, phân tử lượng 362,465 và công thức cấu tạo của cortisol được trình bày trên Hình 1.3.



Hình 1.3. Công thức cấu tạo của cortisol

Mặc dù phản ứng căng thẳng của động vật có xương sống bao gồm cả phản ứng sinh lý và hành vi, nhưng phản ứng sinh lý được nghiên cứu rộng rãi nhất. Ba giai đoạn phản ứng căng thẳng sinh lý ở cá bao gồm thành phần phản ứng chính, thứ cấp và bậc ba [30, 31]:

1. Phản ứng chính (phản ứng thần kinh nội tiết) đối với tác nhân gây căng thẳng bao gồm bao gồm giải phóng nhanh các hormone căng thẳng, catecholamine và corticosteroid vào hệ tuần hoàn. Phản ứng sinh lý này đối với căng thẳng cấp tính bao gồm kích hoạt trục não (brain) – hệ thần kinh giao cảm (sympathetic) – tế bào ái crôm (trục BSC) và trục hạ đồi (hypothalamic) – tuyến yên (pituitary) – liên thận (interrenal) (trục HPI). Khác với động vật có vú, do cá thiếu vỏ thượng thận nên corticosteroid được sản xuất từ tuyến liên thận của đầu thận. Hình 1.4 minh họa về quá trình kích thích trục BSC và trục HPI ở cá để đáp ứng với căng thẳng.



Hình 1.4. Kích thích trục BSC và trục HPI để đáp ứng với căng thẳng ở cá [30]

✚ Ở quá trình kích hoạt trục BSC, các tế bào ái crôm của đầu thận giải phóng catecholamine (adrenaline và noradrenaline). Catecholamine được kiểm soát bởi các yếu tố được giải phóng từ các đầu mút thần kinh giao cảm, chủ yếu là acetylcholine và angiotensin. Tác dụng của catecholamine bao gồm tăng ái lực oxy của hemoglobin, huyết áp động mạch và huy động glucose từ gan và cơ.

✚ Sự kích hoạt trục HPI bao gồm giải phóng yếu tố giải phóng corticotropin (CRF) từ vùng dưới đồi, từ đó kích thích các tế bào corticotropic ở thùy trước tuyến yên sản xuất hormone vỏ thượng thận (ACTH). Sau đó, các tế bào liên thận của đầu thận tổng hợp và giải phóng cortisol vào hệ tuần hoàn. Đối với cá, đầu thận là một mô nội tiết, tạo máu và bạch huyết chính, tương đương với tuyến thượng thận ở động vật có vú.

2. Phản ứng thứ cấp bao gồm nhiều tác động sinh hóa và sinh lý khác nhau như những thay đổi về chuyển hóa (tăng glucose và lactat trong máu và giảm glycogen mô, tăng quá trình chuyển hóa protein, điều hòa chuyển hóa acid amin, đầu ra amoniac và tăng phân giải lipid), rối loạn điều hòa thẩm thấu (cân bằng nước/ion), những thay đổi về các đặc điểm huyết học (hematocrit, leukocrit và hemoglobin), những thay đổi về tế bào (phản ứng protein sốc nhiệt) và điều hòa phản ứng miễn dịch (hoạt động lysozyme và sản xuất kháng thể).

3. Tuy nhiên, nếu cá tiếp xúc với tác nhân gây căng thẳng kéo dài (bán trường diễn hay trường diễn) thì có thể xảy ra phản ứng căng thẳng bậc ba có hại [31]. Phản ứng bậc ba biểu thị những thay đổi về đặc điểm hiệu suất của toàn bộ động vật (giảm tốc độ tăng trưởng, giảm khả năng bơi lội, giảm chức năng miễn dịch và tăng nguy cơ tử vong) và các kiểu hành vi đã thay đổi (ăn uống, hung hăng và sinh sản). Phản ứng căng thẳng bậc ba được cho là kết quả của mức cortisol tăng cao kéo dài không trở lại bình thường do cơ chế phản hồi tiêu cực cạn kiệt.

Để đáp ứng với căng thẳng cấp tính, một số loài cá biểu hiện nồng độ cortisol cao ($10^{-7} - 10^{-6}$ M) trong khi một số loài khác biểu hiện mức cortisol thấp ($10^{-9} - 10^{-8}$ M). Hầu hết các loài cá cho thấy sự gia tăng cortisol trong huyết tương của chúng vào khoảng 0,5–1,0 giờ sau khi bị xáo trộn căng thẳng nhưng cũng có những trường hợp ngoại lệ [30]. Vai trò trung tâm của cortisol đối với phản ứng căng thẳng cấp tính và mãn tính ở cá được sử dụng rộng rãi như một biện pháp sinh lý để đo lường mức độ căng thẳng [31].

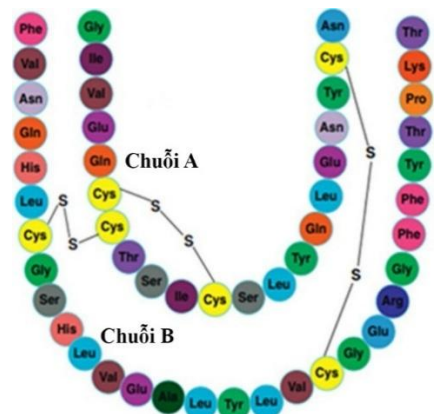
1.3.2. Hormone insulin

Insulin là một loại hormone peptide do tế bào β của đảo tụy Langerhans sản xuất, có tác dụng duy trì lượng đường trong máu bình thường bằng cách tạo điều kiện cho tế bào hấp thụ glucose, điều chỉnh quá trình chuyển hóa carbohydrate, lipid và

protein, đồng thời thúc đẩy sự phân chia và phát triển của tế bào thông qua tác dụng phân bào [32].

Tương tự như các loại động vật có xương sống khác, insulin cá bao gồm hai chuỗi peptide, chuỗi A (21 acid amin) và chuỗi B (30 acid amin). Hai chuỗi này liên kết với nhau bằng hai liên kết disulfide, với một liên kết disulfide bổ sung nằm trong chuỗi A. Trọng lượng phân tử của insulin cá là 5808 Da và được sản xuất trong các đảo Langerhans (cụ thể là các tế bào β) trong tuyến tụy (Hình 1.5)

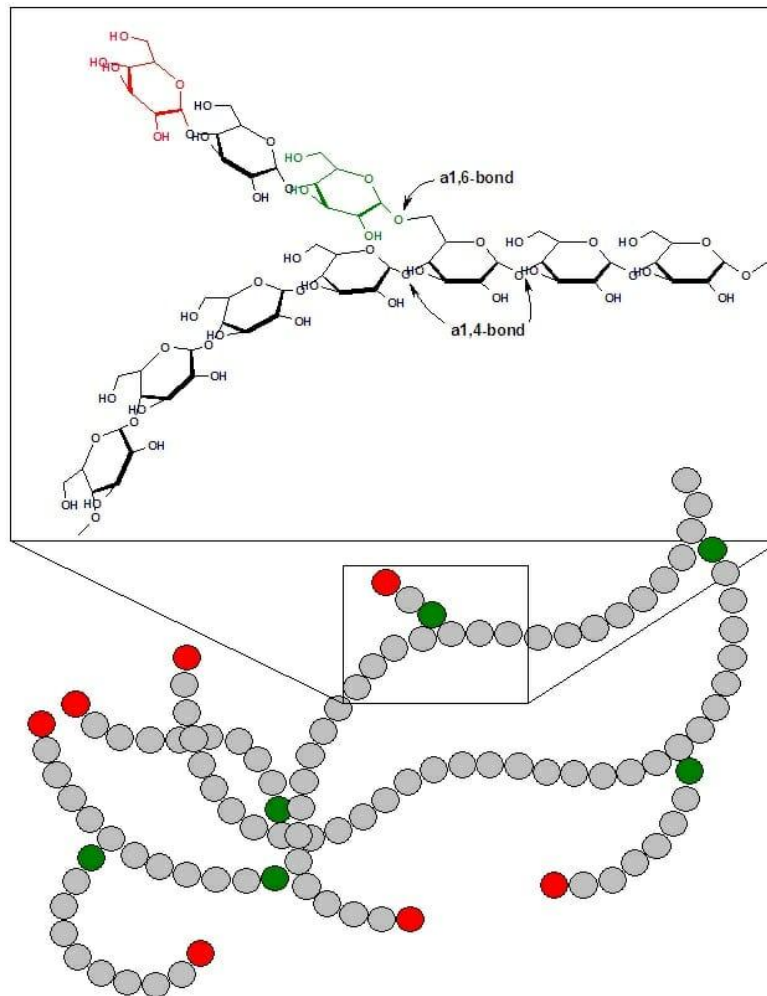
Insulin điều chỉnh nguồn cung cấp năng lượng tế bào và cân bằng chất dinh dưỡng đa lượng, chỉ đạo các quá trình đồng hóa của trạng thái no. Insulin rất cần thiết cho quá trình vận chuyển glucose nội bào vào các mô phụ thuộc insulin như cơ và mô mỡ. Báo hiệu sự dồi dào năng lượng ngoại sinh, quá trình phân hủy chất béo trong mô mỡ bị ức chế và quá trình tổng hợp của nó được thúc đẩy. Trong các tế bào cơ, sự xâm nhập của glucose cho phép tổng hợp và lưu trữ glycogen, và đối với carbohydrate, thay vì acid béo (hoặc acid amin) được sử dụng làm nguồn năng lượng có sẵn ngay lập tức cho sự co cơ. Do đó, insulin có vai trò tăng dẫn nhập glucose vào các tế bào, thúc đẩy quá trình tổng hợp glycogen và lipid trong các tế bào cơ, đồng thời ức chế quá trình phân giải lipid và tân tạo glucose từ các acid amin của cơ. Khi có đủ nguồn cung cấp acid amin, insulin có tác dụng đồng hóa trong cơ [32]. Các yếu tố có thể dẫn đến suy giảm hoặc rối loạn chức năng insulin, ảnh hưởng đến sức khỏe và sự sống của cá bao gồm căng thẳng oxy hóa, mất cân bằng nội tiết tố ô nhiễm môi trường, ... Căng thẳng oxy hóa có thể gây ra tình trạng biếng ăn dẫn đến giảm nồng độ insulin trong huyết tương ở cá, khiến cơ thể chuyển sang trạng thái dị hóa. Ngoài ra, căng thẳng oxy hóa cũng có thể làm suy giảm chức năng tế bào beta tuyến tụy nội tiết (các tế bào chịu trách nhiệm sản xuất insulin). Các hormone như somatostatin có thể ức chế sản xuất insulin ở cá. Tiếp xúc với các chất ô nhiễm có thể gây biến đổi chuyển hóa, làm gián đoạn quá trình sản xuất insulin và cản trở quá trình vận chuyển glucose ở cá.



Hình 1.5. Cấu trúc của insulin (nguồn: Jiaojiao Yu, 2018 [33])

1.3.3. Glycogen

Glycogen là một polymer phân nhánh của glucose, các gốc glucose được liên kết tuyến tính bởi các liên kết glycoside (1→4)- α và cứ khoảng mười gốc này thì có một chuỗi các gốc glucose phân nhánh qua các liên kết glycoside (1→6)- α – được gọi là hạt β . Các liên kết glycoside này tạo ra cấu trúc polymer xoắn ốc có đường kính trung bình khoảng 20 nm với protein glycogenin nằm ở lõi của mỗi hạt glycogen và tham gia vào quá trình tổng hợp glycogen [34, 35]. Cấu trúc của một glycogen được biểu diễn như Hình 1.6.



Hình 1.6. Cấu trúc phân tử glycogen

Các vòng tròn màu xanh lá cây biểu thị các liên kết α -1,6 tại các điểm phân nhánh và các vòng tròn màu đỏ biểu thị các đầu không khử của chuỗi

(Nguồn: <https://biologydictionary.net/glycogen/> [35])

Glycogen là nguồn năng lượng quan trọng sẵn có được dự trữ chủ yếu ở gan và cơ của cá. Glycogen gan để duy trì lượng đường trong máu, trong khi glycogen cơ để tạo năng lượng tức thời trong thời gian nhin ăn hoặc căng thẳng. Đây là nguồn năng lượng chính, đặc biệt là khi thức ăn khan hiếm. Glycogen chiếm 6-10 % trọng lượng

gan. Sự gia tăng kéo dài của glucose trong máu đã kích thích tuyến tụy giải phóng insulin thúc đẩy lưu trữ glucose dư thừa vào các tế bào gan và cơ. Insulin cũng kích hoạt các enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp glycogen. Khi lượng glucose và insulin đủ cao sẽ xảy ra quá trình tổng hợp glycogen (các chuỗi glycogen được kéo dài do các phân tử glucose được thêm vào). Khi lượng glucose và insulin giảm, quá trình tổng hợp glycogen ngừng lại. Khi lượng glucose trong máu giảm xuống dưới một mức nhất định, glucagon được giải phóng từ tuyến tụy sẽ báo hiệu cho các tế bào gan phân hủy glycogen. Glycogen trong gan bị phân giải thành glucose-1-phosphate, rồi chuyển thành glucose và giải phóng vào máu nhằm đáp ứng nhu cầu năng lượng của cơ thể. Do đó, glycogen trong gan đóng vai trò là chất đệm chính của lượng glucose trong máu. Ngoài glucagon, cortisol, epinephrine và norepinephrine cũng kích thích sự phân hủy glycogen. Cá huy động glycogen gan trong thời gian căng thẳng (môi trường nước bị ô nhiễm, thiếu thức ăn trong thời gian dài, lượng đường huyết giảm, bị mắc lưới, ...).

1.4. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÁ RÔ ĐỒNG

Cá rô đồng tên tiếng Anh là climbing perch và tên khoa học là *Anabas testudineus*. Cá rô đồng là loài cá nước ngọt lưỡng cư thuộc họ Anabantidae của bộ Perciformes, phân bố khắp Châu Á bao gồm miền nam Trung Quốc, Việt Nam, Lào, Campuchia, Thái Lan, Myanmar, Philippines, Pakistan, Ấn Độ, Bangladesh, Sri Lanka.

Cá rô đồng có thân thon dài, phần sau của thân dẹp ngang, phần đầu và phía trước thân thì rộng và dẹt dần về phía sau (Hình 1.7). Cá rô đồng hoang dã thường có màu xám hoặc xanh xám đậm trong khi cá rô đồng nuôi thường có màu sắc nhạt hơn, tùy thuộc vào thức ăn, môi trường sống, độ tuổi và giới tính của cá.



Hình 1.7. Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) sử dụng trong nghiên cứu

Cá rô đồng sinh sống ở hồ chứa, cánh đồng ngập nước, kênh rạch chảy chậm, đầm lầy và cửa sông. Cá rô đồng có thể chịu được điều kiện môi trường nước khắc nghiệt (nước bị ô nhiễm và thiếu oxy), vì có cơ quan hô hấp không khí phụ trợ gọi là

mang phụ [36]. Cá rô đồng giàu protein chất lượng giúp hỗ trợ các mô của cơ thể, chất béo trong cá rô đồng chủ yếu là chất béo không bão hòa tốt cho sức khỏe tim mạch. Bên cạnh đó trong cá còn chứa nhiều vitamin và khoáng chất thiết yếu như vitamin A, B1, B2, C, D, photpho, canxi, sắt, ... Thêm vào đó trong cá rô đồng chứa hàm lượng Omega-3, hàm lượng canxi cao giúp giảm nguy cơ mắc các bệnh tim mạch, cải thiện trí nhớ và hỗ trợ, duy trì, cải thiện hệ xương khớp. Tuy nhiên hàm lượng calo trong cá thấp (khoảng 100 calo/100g thịt cá) vì vậy giúp ít rất nhiều cho người ăn kiêng [37]. Mặc dù có nhiều giá trị dinh dưỡng và là một trong những loại cá có tầm quan trọng về mặt thương mại ở Việt Nam cũng như các nước Đông Nam Á khác tuy chưa có những thống kê cụ thể về sản lượng như cá tra hay cá rô phi nhưng cá rô đồng vẫn mang đến hiệu quả kinh tế khá cao với lợi nhuận có thể đạt từ 500 đến 600 triệu đồng/năm từ các mô hình nuôi hiệu quả ở cấp độ hộ gia đình hoặc trang trại. Tuy nhiên do đặc tính ăn tạp và khả năng thích nghi tốt trong môi trường nước kém chất lượng, thiếu oxy và chứa nhiều chất độc hại, cá rô đồng có nguy cơ cao tích tụ các chất ô nhiễm trong cơ thể, bao gồm kim loại nặng, thuốc trừ sâu, và các chất độc hại khác.

1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

Tình trạng nước ô nhiễm kim loại nặng ngày càng phổ biến và đáng báo động trong những năm gần đây. Ô nhiễm kim loại nặng trong môi trường nước là một vấn đề nghiêm trọng do tính chất độc hại, dai dẳng, tích tụ sinh học và phóng đại sinh học của chúng. Cá sống trong môi trường nước ô nhiễm. Quá trình tích tụ sinh học và sự khuếch đại sinh học ở cá là những con đường chính để kim loại nặng từ môi trường nước xâm nhập vào chuỗi thức ăn. Tiếp xúc với kim loại nặng có thể dẫn đến một loạt các tác động xấu đến sức khỏe bao gồm tổn thương thần kinh, rối loạn phát triển, tổn thương thận, ...

1.5.1. Tình hình nghiên cứu về tích lũy kim loại nặng trong nước

Các nghiên cứu trong nước chủ yếu là đánh giá mức độ tích lũy kim loại nặng trong trầm tích sông, điều tra hàm lượng kim loại nặng trong cá phổ biến. Một số nghiên cứu về tích lũy kim loại nặng tiêu biểu được trình bày trong Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Một số nghiên cứu về kim loại nặng trong nước

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
Hg, Cd, Pb, Cr	Các loài hến (<i>Corbicula subsulcata</i>), ngao dầu	- Hàm lượng Hg trong các loài hến và hào tại khu vực cửa	2014	[38]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
	(<i>Meretrix meretrix</i>), vẹm xanh (<i>Perna viridis</i>) và hào (<i>Saccostrea</i> sp.) tại các khu vực cửa Thuận An, Sông Hàn, Cửa Đại, Sa Cần, Sông Kôn - đầm Thị Nại	Thuận An cao hơn giới hạn tối đa cho phép của bộ y tế (QCVN 8-2:2011/BYT). - Hàm lượng Cd vượt quá giới hạn cho phép (QCVN 8-2:2011/BYT) tại một số địa điểm ở cửa Đại và cửa Sa Cần. - Hàm lượng Pb trung bình trong hầu hết các loài hai mảnh vỏ tại tất cả các cửa sông đã vượt giới hạn cho phép (QCVN 8-2:2011/BYT), trong đó khoảng 65% số mẫu vượt giới hạn tối đa cho phép từ 1,5 đến 2,8 lần. - Hàm lượng Cr trong ngao dầu, vẹm xanh, hào tại cửa Sông Hàn và trong hào, hến tại cửa Sa Cần vượt quá giới hạn tối đa cho phép.		
Cu, Pb, Zn, Cd	Nguồn nước tầng đáy, bùn	- Nồng độ trung bình của nhóm kim loại nặng trong bùn thấp hơn giới hạn cho phép (QCVN 43:2012/BTNMT) và tiêu chuẩn PEL (1999), trong nước thấp hơn giới hạn cho phép theo QCVN 38:2011/BTNMT.	2014	[39]
Cu, Pb, Zn, Cd	Tích lũy trong cơ, gan, ruột và mang cá chép <i>Cyprinus carpio</i>	- Đối với cá, kim loại nặng tập trung chủ yếu trong gan, ruột, mang và ít nhất trong cơ.	2014	[39]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
		- Thứ tự tích tụ kim loại trong cá chép: Zn > Cu > Pb > Cd. Nồng độ Cu, Zn, Pb, Cd trong cơ lần lượt là 1,32; 30,96; 0,09; 0,01mg/kg; trong gan lần lượt là 2,36; 75,43; 0,08; 0,08 mg/kg; trong ruột lần lượt là 12,18; 137,33; 0,36; 0,03 mg/kg và trong mang lần lượt là 2,23; 140,92; 1,78; 0,09 mg/kg (tính theo khối lượng ướt).		
As, Cd, Hg, và Pb	Loài động vật hai mảnh vỏ ngao trắng (<i>Meretrix lyrata</i>) and loài hào (<i>Saccostrea glomerata</i>) ở Vân Đồn - Quảng Ninh	- Thứ tự nồng độ kim loại nặng là As > Hg > Cd > Pb đối với loài ngao. - Đối với loài hào là As > Cd > Hg > Pb. - Nồng độ As trung bình (3 vị trí lấy mẫu) là $3,72 \pm 1,89$ mg/kg đối với hào và $1,56 \pm 0,41$ mg/kg đối với ngao nuôi tại Vân Đồn - Quảng Ninh (tính theo khối lượng ướt).	2020	[40]
Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Hg	Cá Dìa tro (<i>Siganus fuscescens</i> Houttuyn, 1782) ở tỉnh Quảng Bình	- Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Hg trong gan, mang và cơ của các mẫu cá Dìa tro đều nhỏ hơn giới hạn quy định của Bộ Y tế Việt Nam. - Các giá trị EDI (lượng kim loại tiêu thụ hàng ngày) đều dưới ngưỡng lượng ăn vào hàng ngày có thể chấp nhận	2020	[41]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
		được (PTDI) quy định bởi Bộ Y tế, đồng thời tất cả các giá trị THQ (chỉ số nguy hại) và HI (chỉ số nguy hiểm) ở nam và nữ giới đều không vượt quá 1 - Không có nguy cơ rủi ro đến sức khỏe khi tiêu thụ cá Dìa tro tại ven biển Quảng Bình.		
Pb, Cd, As, Cu, Zn	Trầm tích mặt tại một số cửa sông ven biển tỉnh Thái Bình	- Hàm lượng Pb, Cd, As, Cu, Zn trong các mẫu trầm tích tại ba cửa sông: Thái Bình, Diêm Hộ và Trà Lý dao động trong khoảng 0,043 - 145,833 mg/kg. - Hàm lượng trung bình của các kim loại giảm dần theo thứ tự $Zn > Pb > Cu > As > Cd$.	2024	[42]
Pb, Cr, Cd	Các cửa sông Hàn, sông Cu Đê (Đà Nẵng) và sông Vu Gia - Thu Bồn (Quảng Nam)	- Hàm lượng Pb, Cr, Cd trong các mẫu trầm tích tại khu vực cửa sông Hàn, sông Cu Đê và sông Vu Gia - Thu Bồn khá thấp khi đều nằm trong giới hạn cho phép theo quy định về chất lượng trầm tích (QCVN 43:2017/BTNMT). - Hàm lượng Cd^{2+} trong nước tương đối thấp ở tất cả các vùng cửa sông với giá trị đều nằm trong giới hạn cho phép về chất lượng nước mặt (QCVN 08:2023/ BTNMT).	2024	[43]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
		- Hàm lượng Cr^{6+} và Pb^{2+} trong một số mẫu nước vượt giới hạn cho phép của QVCN 08:2023/BTNMT.		

1.5.2. Tình hình nghiên cứu về tác động độc hại kim loại nặng trên thế giới

Gần đây, các nghiên cứu về tác động độc hại của kim loại nặng đối với cá chủ yếu tập trung vào tích tụ sinh học, căng thẳng oxy hóa và tổn thương mô. Bảng 1.2 trình bày một số nghiên cứu tiêu biểu liên quan đến tác động độc hại kim loại nặng đối với cá.

Bảng 1.2. Một số nghiên cứu tiêu biểu về tác động độc hại kim loại nặng đối với cá

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
As, Pb	Lượng glycogen và một số enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa carbohydrate trong các mô gan và cơ của cá da trơn nước ngọt (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	- Độc cấp tính (LC_{50} 96 giờ) của As_2O_3 và PbCl_2 đối với <i>H. fossilis</i> lần lượt là 35,09 mg/L và 66,20 mg/L. - Tiếp xúc lâu dài (20 ngày) As_2O_3 và PbCl_2 (20 mg/L), mức glycogen trong gan và cơ của <i>H. fossilis</i> bị cạn kiệt - Lượng glycogen trong gan và cơ được phục hồi sau 30 ngày. - Hoạt động của các enzyme chuyển hóa glycogen (glycogen phosphorylase và glycogen synthase) và một số enzyme glycolytic (hexokinase, phosphofructokinase và pyruvate kinase) cũng bị thay đổi ở <i>H. fossilis</i>.	2019	[44]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
		- As và Pb gây ra căng thẳng độc tính đối với <i>H. fossilis</i>, từ đó thay đổi quá trình chuyển hóa carbohydrate.		
Cu	Sự phát triển, stress oxy hóa, phản ứng miễn dịch và sinh hóa ở cá rô phi sông Nin (<i>Oreochromis niloticus</i>)	- Tiếp xúc lâu dài với Cu (40 và 400 µg/L) không gây tử vong ở cá nhưng sự phát triển của cá bị ảnh hưởng và tích tụ Cu trong gan > mang. - Hoạt động của các enzym chống oxy hóa như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST) trong mang và gan cá có tiếp xúc với Cu giảm đáng kể. - Các chất chống oxy hóa không phải enzym như glutathione (GSH) and metallothionein (MT) tăng đáng kể. - Các chỉ số căng thẳng oxy hóa như malondialdehyde (MDA) và protein carbonyl (PCO) trong mang và gan của cá tiếp xúc với Cu tăng đáng kể. - Những thay đổi trong các enzym chống oxy hóa và căng thẳng oxy hóa là các dấu hiệu sinh học của độc tính kim loại trong hệ sinh thái dưới nước.	2019	[45]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
Cu, Ni, Fe, Cd, Pb, Zn và Hg	Năm loài cá như cá mòi (<i>Sardinella aurita</i>) Cá cơm (<i>Engraulis encrasicolus</i>) Cá thu (<i>Scomber colias</i>) Hai loài cá tráp (<i>Brachydeuterus auritus</i> và <i>Pagellus bellottii</i>) từ Vịnh Guinea	- Trên cơ sở trọng lượng khô, nồng độ Cd và Pb trong tất cả các loài cá được phân tích đều thấp hơn giới hạn phát hiện (0,01 mg/kg cho Cd và 0,05 mg/kg cho Pb), do đó gây ra rủi ro cho sức khỏe rất thấp. - Trên cơ sở trọng lượng ướt, nồng độ kim loại trung bình trong thịt cá là: + 0,04 - 0,31 mg/kg đối với Cu, + 1,23 - 3,87 mg/kg đối với Fe, + 0,20 - 0,39 mg/kg đối với Ni, + 0,17 - 0,42 mg/kg đối với Zn, + 0 - 0,05 mg/kg đối với Hg.	2021	[46]
Cu, Pb, Zn, Cr, Fe, Mn	Sự tích tụ sinh học của kim loại nặng và tác động của chúng lên các dấu ấn sinh học (huyết học và sinh học) đối với cá anh vũ vàng (<i>Tor putitora</i>) sống trong nước thải của dự án thủy điện sông Panjkora	- Nồng độ kim loại nặng được tích lũy cao nhất trong gan tiếp theo là thận. - Fe được tích lũy nhiều nhất, tiếp theo là Zn. - Các gốc oxy hóa hoạt động (ROS) và quá trình peroxy hóa lipid (LPO) trong các mô của cá sống trong nước ô nhiễm cao hơn nhiều so với cá tham chiếu. Ngoài ra, các mức ROS và LPO trong gan cao hơn so	2021	[47]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
		với các bộ phận khác (mang, thịt, thận). - Tổng hàm lượng protein trong các mô của cá sống trong nước ô nhiễm giảm đáng kể so với cá đối chứng. - Mức độ cortisol và hoạt động của các enzym chống oxy hóa ở cá sống trong nước ô nhiễm tăng cao hơn đáng kể so với cá đối chứng. - Mức độ cortisol tăng cao có thể là do sự hợp tác tích cực giữa hệ miễn dịch với trục liên thận tuyến yên để loại bỏ kim loại nặng.		
Cr	Các mô (da, cơ, gan, bong bóng bơi, ruột và mang) của cá trắm cỏ nước ngọt (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	- Cá trắm cỏ phơi nhiễm Cr^{6+} (120, 40 và 10 mg/L) trong 7, 25 và 60 ngày, kết quả Cr tích tụ ở nồng độ cao nhất trong ruột > mang > gan > túi mật > da > cơ - Mức độ tích tụ Cr^{6+} (nồng độ 20 mg/L trong 40 ngày) là ruột > gan > mang > da > cơ > túi mật.	2022	[48]
Sự kết hợp của CuSO_4 và Trichlofon	Gan của cá ngựa vằn (<i>Zebrafish</i>)	- Các tổn thương tế bào gan đã được tìm thấy ở cá ngựa vằn tiếp xúc với Cu (0,5 mg/L) và trichlorfon (0,5 mg/L) riêng lẻ và kết hợp trong 21 ngày. - Hoạt động của enzyme chống oxy hóa và miễn dịch trong	2023	[49]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
		gan cá ngựa vằn được kích hoạt đáng kể vào ngày thứ 7 và ngày thứ 21. - Cu và trichlorfon riêng lẻ và kết hợp đã tác động đến quá trình trao đổi chất, tăng trưởng và miễn dịch.		
Pb	Sự tích tụ mô, hành vi, thay đổi về hình thái và sinh hóa máu ở cá chép (<i>Cyprinus carpio</i>)	- Cá chép ($115 \pm 5,23\text{g}$) tiếp xúc với nhiều nồng độ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 19,33; 38,66 và 58,0 mg/L trong 10 và 20 ngày. - Sự tích tụ Pb trong mang và gan cá tăng đáng kể sau 10 và 20 ngày tiếp xúc trong khi cơ tích tụ ít hơn so với mang và gan. - Các thông số huyết học (lượng hồng cầu, lượng bạch cầu, hemoglobin và hematocrit) giảm khi mức $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ tăng cao. - Hành vi và hình thái của cá chép tiếp xúc với $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ cũng thay đổi đáng kể. - Hoạt động của enzyme gan (Alanine aminotransferase và aspartate aminotransferase), glucose và mức lipid tăng lên, trong khi tổng lượng protein giảm.	2024	[50]
Cu, Zn, Cd, Pb, As và Se	Cá hồi masu (<i>Oncorhynchus masou</i> , Salmonidae) sống trong	Tích tụ kim loại nặng trong cơ của cá hồi masu sống trong nước ô nhiễm cao hơn nhiều	2025	[51]

Kim loại nặng	Đối tượng nghiên cứu	Kết quả nghiên cứu	Năm thực hiện	Nguồn
	nước bị ô nhiễm bởi công nghiệp khai thác mỏ	lần so với cá sống trong nước sông tham chiếu (không bị ô nhiễm), cụ thể: + Cu: 1,4 – 2,5 lần + Zn: 1,5 – 1,9 lần + Cd: 188 – 520 lần + Pb: 4,6 – 68,0 lần + As: 1,1 – 3,9 lần + Se: 2,8 – 3,5 lần		

1.5.3. Kết luận về những nghiên cứu tác động độc hại về kim loại nặng trong và ngoài nước

- Đối với các nghiên cứu trong nước, các kết quả chủ yếu dừng lại ở việc điều tra mức độ tích lũy kim loại nặng trong các động vật thủy sinh (hàu, cá, ngao, ...) sống vùng trầm tích, cửa biển nhằm cảnh báo nguy cơ phơi nhiễm kim loại nặng vào chuỗi thức ăn.

- Còn với các nghiên cứu ngoài nước đã (i) nhấn mạnh tầm quan trọng của việc theo dõi và giảm thiểu ô nhiễm kim loại nặng trong môi trường nước để bảo vệ các sinh vật và hệ sinh thái nước ngọt; (ii) nêu bật sự tích tụ sinh học, phóng đại sinh học và các tác động độc hại của kim loại nặng (thông số huyết học, căng thẳng oxy hóa, độc tính thần kinh, hoạt động của các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa, ...) đối với cá và sinh vật thủy sinh.

Mặc dù nghiên cứu hiện tại đã cung cấp những hiểu biết có giá trị về tác động độc hại của kim loại nặng, tuy nhiên để tìm được những nghiên cứu một cách hệ thống về tác động cũng như ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh hóa và khả năng đào thải của các kim loại nặng này trên một loài nhất định để có cái nhìn tổng quan và sự hiểu biết đầy đủ về khả năng tương tác phức tạp giữa kim loại nặng và hệ sinh thái nước ngọt còn nhiều hạn chế. Vì vậy, một nghiên cứu có hệ thống về độc tính của kim loại nặng trong các hệ sinh thái nước ngọt là rất quan trọng để nâng cao hiểu biết về các mối đe dọa do các chất ô nhiễm gây ra và phát triển các chiến lược hiệu quả để bảo vệ môi trường nước và sức khỏe con người.

Nhiệm vụ đặt ra: Nghiên cứu một cách có hệ thống từ việc xác định ngưỡng độc cấp tính đến tác động độc tính bán trường diễn của Pb và Cd lên cơ thể của cá rô đồng (một loại cá phổ biến và có giá trị thương mại ở Việt Nam) thông qua việc tìm

kiểm quy luật tích lũy, đào thải của các kim loại nặng này trên mang, gan và thịt cá và ảnh hưởng của các kim loại này đến hoạt động của các hormone cortisol, hormone insulin và glycogen gan. Việc hiểu được ảnh hưởng của các kim loại này lên các chỉ tiêu sinh hóa ở cá là chìa khóa để phát triển các chỉ thị sinh học và chiến lược nhằm bảo vệ hệ sinh thái dưới nước.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Cá rô đồng

Cá rô đồng có tên khoa học là *Anabas testudineus*, sống ở môi trường nước ngọt và nước lợ như ruộng, ao, đầm, mương. Đây là loài động vật ăn tạp nhưng rất quen thuộc trong bữa ăn của người Việt Nam nên được chọn làm đối tượng nghiên cứu của luận án này.

Cá rô đồng khi trưởng thành có chiều dài khoảng 12,0 cm và cân nặng khoảng 100,0 g/con, cá được chọn trong nghiên cứu là loại cá chưa trưởng thành có kích thước khoảng $9 \pm 0,5$ cm và cân nặng khoảng $13,0 \pm 1,5$ g được mua tại trại cá giống Tâm Sạch (địa chỉ: 27 đường số 1, p. Hiệp Bình Chánh, TP. Thủ Đức, TP.HCM). Cá được thuần dưỡng trong bể composite bằng vật liệu PP trong 12 ngày để làm quen với môi trường trước khi bắt đầu cho tiếp xúc với kim loại nặng [52], kích thước mỗi bể là 1,0 m $\times$ 0,8 m $\times$ 0,62 m (chiều dài $\times$ chiều rộng $\times$ chiều cao), tổng diện tích bề mặt là 0,8 m² [53]. Cá được nuôi trong bể có sục không khí có lượng oxy hòa tan (DO) là $6,5 \pm 0,7$ mg/L, nhiệt độ nước trong bể là khoảng $28 \pm 4^\circ\text{C}$ với pH là 6,3 và được chiếu sáng 10 giờ/ngày. Phòng nuôi cá được duy trì nhiệt độ khoảng $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Cá được cho ăn bằng thức ăn hỗn hợp dạng viên có hàm lượng đạm 30 % và hàm lượng béo lớn hơn 6 %. Lượng thức ăn cho mỗi lần ăn của cá ước tính khoảng 4 % tổng trọng lượng cá. Nước trong bể được lọc tuần hoàn và thay mới 02 ngày/lần, mỗi lần 25 % thể tích nước trong bể.

2.1.2. Cortisol

Cortisol là một loại hormone glucocorticoid được sản sinh bởi bộ phận liên thận. Cortisol là thành phần rất quan trọng của hệ thống phản ứng căng thẳng của cơ thể. Nó ảnh hưởng đến chuyển hóa carbohydrate, protein và lipid.

2.1.3. Insulin

Insulin là một protein hormone quan trọng trong cơ thể được sản xuất bởi tuyến tụy. Chức năng chính của insulin là điều hòa lượng glucose trong máu nhằm đảm bảo các tế bào có đủ năng lượng để hoạt động. Ngoài ra, insulin cũng điều chỉnh (gây ức chế hoặc tăng cường) hoạt tính của enzyme cho quá trình biến đổi glucose tổng hợp glycogen.

2.1.4. Glycogen

Glycogen là một đại phân tử polysaccharide đa nhánh của glucose có vai trò quan trọng trong việc dự trữ năng lượng của sinh vật. Glycogen thường trải qua hai quá trình chuyển hóa chính đó là tổng hợp glycogen (quá trình chuyển đổi glucose

thành glycogen để dự trữ) và phân giải glycogen (quá trình phân hủy glycogen thành glucose khi cơ thể cần năng lượng). Gan và thịt là hai bộ phận lưu trữ glycogen chính trong cơ thể.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu độc cấp tính (LC_{50}) của từng kim loại nặng (Pb, Cd) đối với cá rô đồng;
- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Pb, Cd lên quy luật tích lũy và đào thải Pb, Cd trong mang, gan và thịt của cá rô đồng;
- Tác động độc tính bán trường diễn của Pb, Cd đến sự thay đổi nồng độ cortisol trong huyết tương, insulin trong máu và glycogen trong gan của cá rô đồng.

2.2.2. Thiết kế thí nghiệm

Các thí nghiệm được lập theo tài liệu hướng dẫn sử dụng cá trong nghiên cứu [52]. Cadimi (Cd) và chì (Pb) được thêm vào nước nuôi cá dưới dạng muối $Pb(CH_3COO)_2$ và $CdCl_2$ để đánh giá độc cấp tính và độc tính bán trường diễn của chúng đối với cá rô đồng.

2.2.2.1. Nghiên cứu độc cấp tính (LC_{50} trong 96 giờ) của Pb và Cd

- Thí nghiệm được thực hiện với chế độ nước tĩnh và không thay nước trong vòng 96 giờ và được sục không khí để đảm bảo lượng oxy hòa tan cần thiết cho cá.
- Nước đối chứng là nước sạch được chứa trong bể để giảm nồng độ clo, hàm lượng các ion Pb^{2+} và Cd^{2+} (được phân tích theo TCVN 13092:2020) trong nước đối chứng lần lượt là 0,01 mg/L và 0,005 mg/L (hàm lượng này trong giới hạn cho phép của Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về chất lượng nước mặt – QCVN 08-MT:2015/BTNMT) và không bổ sung muối Pb, Cd.
- Nước ô nhiễm là nước sạch được thêm vào các kim loại Pb, Cd dưới dạng muối $Pb(CH_3COO)_2$ và $CdCl_2$.
 - + Nồng độ Pb^{2+} : 30; 75; 90; 100; 150; 175 và 200 mg/L;
 - + Nồng độ Cd^{2+} : 3; 5; 10; 20; 30; 40; 50 và 75 mg/L.
- Mỗi nồng độ được nuôi lặp lại 4 lần.
- Khoảng 60 cá thể cá được lựa chọn ngẫu nhiên cho mỗi nồng độ Pb^{2+} (Pb) hay Cd^{2+} (Cd), mỗi nồng độ Pb hay Cd gồm 4 bể nuôi, mỗi bể nuôi 15 cá. Giai đoạn này không cho cá ăn. Số cá chết được vớt ra để tránh ảnh hưởng đến chất lượng nước thí nghiệm do xác chết thối rữa. Theo dõi số lượng cá chết trong 24, 48, 72 và 96 giờ. Xây dựng đồ thị tương quan giữa nồng độ Pb hay Cd trong nước với tỷ lệ cá chết (dose-mortality), ước lượng LC_{50} của từng kim loại nặng.

2.2.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn (sub-chronic) của Pb và Cd

a. Điều kiện nuôi cá giai đoạn phơi nhiễm Pb và Cd

Với độc tính bán trường diễn nồng độ chọn nghiên cứu là nồng độ thấp hơn ngưỡng độc cấp tính mà vẫn đảm bảo sự sống cho cá.

- Cá được nuôi trong các bể PP được đặt trong phòng ổn định nhiệt ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), chiếu sáng 10 giờ/ngày.

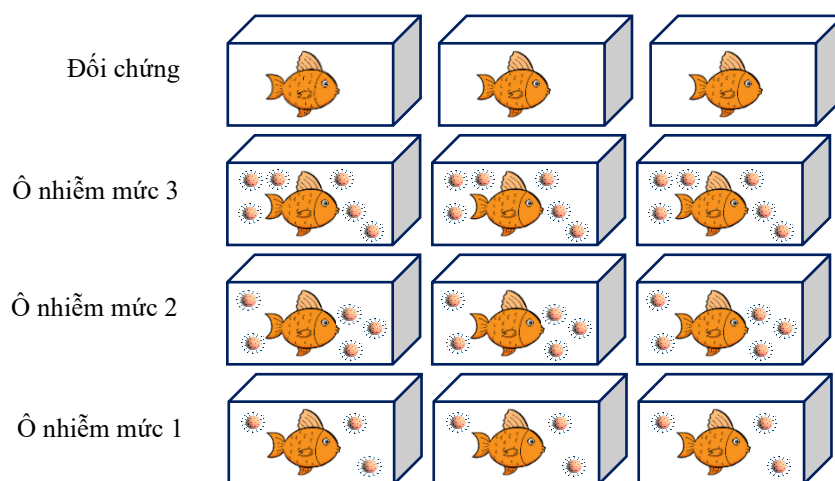
- Nước đối chứng là nước sạch không bổ sung Pb, Cd.

- Nước ô nhiễm là nước sạch được bổ sung các kim loại Pb, Cd dưới dạng muối $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ và CdCl_2 .

+ Nồng độ Pb^{2+} : 20; 30 và 40 mg/L;

+ Nồng độ Cd^{2+} : 3; 5 và 10 mg/L.

- Độ lặp lại của các thí nghiệm là 03 lần ($n = 3$).



Hình 2.1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm

- Cá dùng để nghiên cứu có chiều dài $9,0 \pm 0,5$ cm, cân nặng $13,0 \pm 1,5$ g, được nuôi trong các bể PP với số lượng 25 cá thể cá/bể (mật độ $0,032 \text{ m}^2/\text{cá}$) và được sục không khí để đảm bảo lượng oxy hòa tan cho sự sống của cá. Cá được cho ăn bằng thức ăn hỗn hợp dạng viên có hàm lượng đạm 30 % và hàm lượng béo lớn hơn 6 %. Lượng thức ăn cho mỗi lần ăn của cá ước tính khoảng 4 % tổng trọng lượng cá và được nuôi làm quen với môi trường trong vòng 12 ngày trước khi gây nhiễm Pb^{2+} hay Cd^{2+} . Đối với cá đối chứng cũng được nuôi cùng điều kiện nhưng không gây nhiễm kim loại nặng.

- Nước sử dụng là nguồn nước thủy cục được chứa trong bể để giảm nồng độ clo và hàm lượng các ion Pb^{2+} và Cd^{2+} (được phân tích theo TCVN 13092:2020) trong nước đối chứng lần lượt là 0,01 mg/L và 0,005 mg/L (hàm lượng này trong giới hạn cho phép của Quy chuẩn Kỹ thuật Quốc gia về chất lượng nước mặt – QCVN 08-MT:2015/BTNMT), nhiệt độ của nước duy trì khoảng $28 \pm 4^\circ\text{C}$ và pH khoảng 6,3.

Nước được thay mới 02 ngày/lần. Sau mỗi lần thay nước, nồng độ Pb và Cd sẽ được phân tích nhằm đảm bảo không có sự khác biệt với nồng độ Pb và Cd ban đầu.

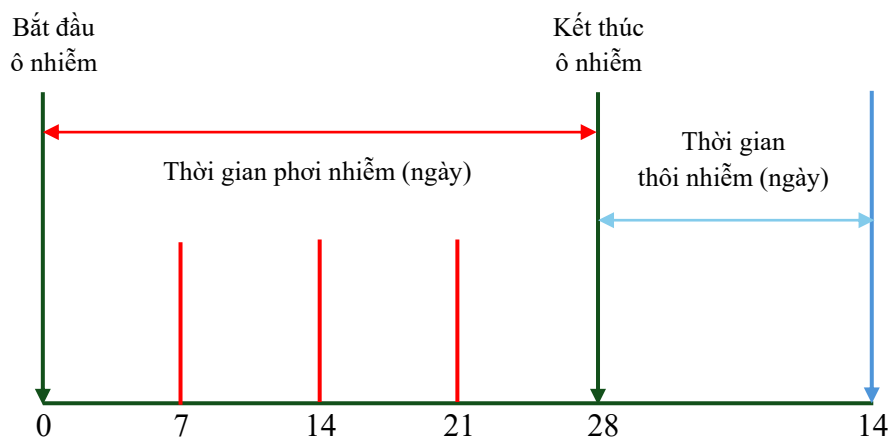
- Thí nghiệm xác định tăng trưởng của cá rô đồng trong giai đoạn phơi nhiễm và thôi nhiễm được thực hiện bằng cách nuôi 05 cá thể cá với số nghiệm thức, mật độ và chế độ nuôi tương tự như nuôi cá phơi nhiễm và thôi nhiễm, và tại ngày thứ 7, 14, 21, 28 của quá trình phơi nhiễm, ngày thứ 14 của quá trình thôi nhiễm cá sẽ được mang đi cân trọng lượng, đo kích thước và trả lại trong bể tiếp tục nuôi cho các lần đo tiếp theo.

b. Điều kiện nuôi cá giai đoạn thôi nhiễm Pb và Cd

Cá được nuôi trong các bể PP bằng nước sạch. Các bể này được đặt trong phòng ổn định nhiệt ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), chiếu sáng 10 giờ/ngày. Độ lặp lại của các thí nghiệm là 03 lần ($n = 3$). Nhiệt độ của nước duy trì khoảng $28 \pm 4^\circ\text{C}$ và pH khoảng 6,3. Nước được thay mới 02 ngày/lần.

c. Lấy mẫu phân tích

Mẫu được lấy vào lúc 8:00-9:00 sáng của các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ khi cá bắt đầu sống trong nước ô nhiễm Pb, Cd để nghiên cứu sự tích lũy và ảnh hưởng của các kim loại này đến sự thay đổi cortisol, insulin, glycogen. Mẫu cũng được lấy vào lúc 8:00-9:00 sáng của ngày thứ 14 kể từ khi cá ô nhiễm được sống trong nước sạch để nghiên cứu sự đào thải Pb và Cd. Trên Hình 2.2 trình bày sơ đồ thời gian lấy mẫu để phân tích hóa học.



Hình 2.2. Sơ đồ thời gian lấy mẫu để phân tích hóa học

Mỗi bể thí nghiệm, lấy ngẫu nhiên 05 cá thể cá và rửa bằng nước sạch dưới vòi, sau đó rửa lại bằng nước cất hai lần trước khi lấy mẫu máu và các mô (mang, gan, thịt) để phân tích hóa học. Máu được lấy từ mạch máu dọc theo cột sống của cá rô đồng bằng kim tiêm và được xử lý theo phương pháp thích hợp để phân tích cortisol và insulin. Mang, gan và thịt cá được xử lý theo phương pháp thích hợp để phân tích hàm lượng kim loại Pb, Cd và glycogen trong gan. Các mẫu dùng phân tích cortisol,

insulin hay glycogen được phân tích trong ngày, còn các mẫu mô mang, gan, thịt phân tích Pb và Cd được trữ trong túi zip và đông lạnh ngay sau khi mổ.

Lượng Pb và Cd đào thải trong quá trình thôi nhiễm được tính theo công thức:

$$\% \text{ đào thải} = \frac{|[M]_{\text{thôi ô nhiễm}} - [M]_{\text{ô nhiễm}}|}{[M]_{\text{ô nhiễm}}} \times 100$$

Trong đó:

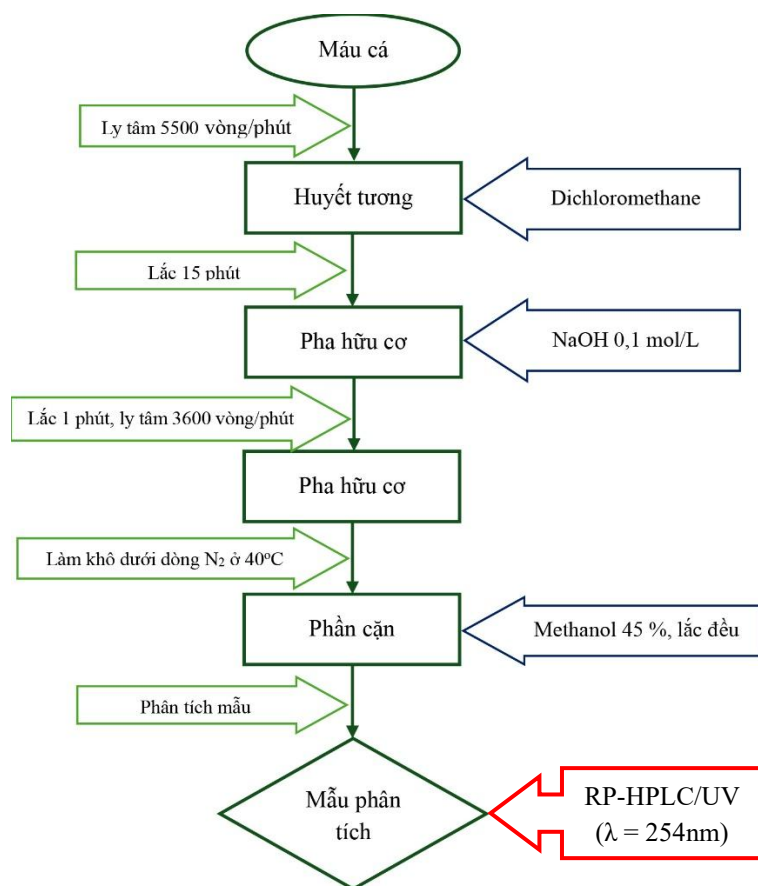
$[M]_{\text{ô nhiễm}}$: hàm lượng kim loại nặng trong cá sau 28 ngày ô nhiễm;

$[M]_{\text{thôi ô nhiễm}}$: hàm lượng kim loại nặng trong cá sau 14 ngày thôi ô nhiễm.

2.2.3. Phương pháp phân tích hóa học

2.2.3.1. Phân tích hàm lượng cortisol

Sơ đồ xử lý mẫu máu để phân tích cortisol được trình bày trên Hình 2.3.



Hình 2.3. Quy trình xử lý mẫu máu để phân tích hàm lượng cortisol

a. Xử lý mẫu

Máu cá được ly tâm tốc độ 5500 vòng/phút trong 5 phút, tách lấy huyết tương cá. Dùng miropipet lấy 500 μ L huyết tương cho vào ống ly tâm polypropylen (16 $\times$ 125 mm), thêm vào đó 5000 μ L dichloromethan. Đậy nắp cẩn thận rồi lắc mạnh trong 15 phút để chiết cortisol sang pha hữu cơ. Sau đó ly tâm ở tốc độ 3600 vòng/phút trong 15 phút. Chuyển pha hữu cơ sang ống ly tâm mới (16 $\times$ 125 mm) rồi rửa bằng 500

μL NaOH 0,1 M, lắc trong 1 phút. Tiếp tục ly tâm ở tốc độ 3600 vòng/phút trong 5 phút. Hút bỏ dung dịch rửa, phần dung môi hữu cơ được đặt vào bể điều nhiệt để làm khô dưới dòng khí nitơ ở 40°C . Phần cặn được hòa tan bằng 500 μL 45 % methanol trong nước, lắc trộn 20 giây, lọc qua màng lọc 0,22 μm [54].

b. Điều kiện phân tích sắc ký

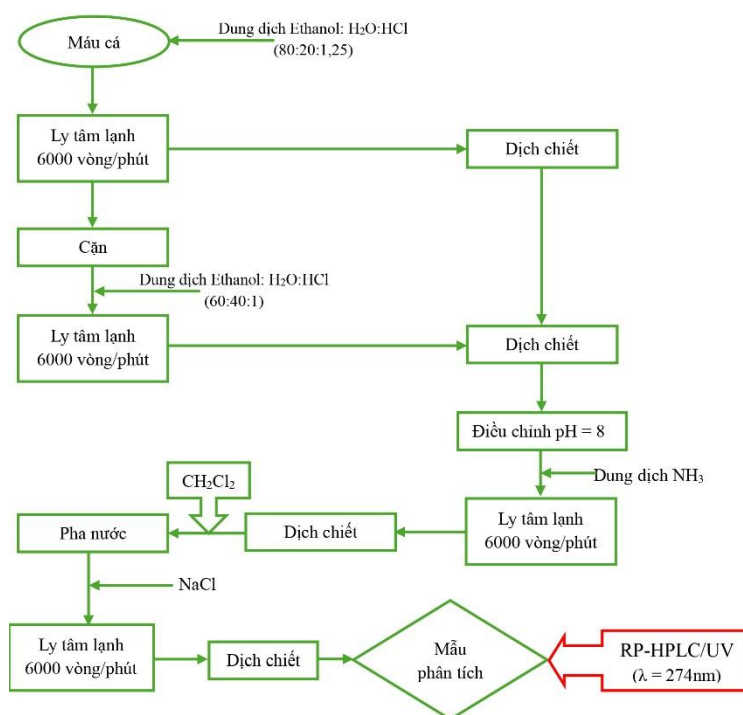
Cột sắc ký được sử dụng là hypersil BDS-C18, $125 \times 4,0\text{mm}$ I.D., kích thước hạt 5 μm . Nhiệt độ trong cột là 36°C . Pha động được chọn là methanol, nước theo tỷ lệ tương ứng 45:55 (v/v). Tốc độ dòng 0,8 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu là 50 μL . Đầu dò DAD lấy sắc đồ cortisol tại bước sóng 254 nm.

c. Chuẩn bị dung dịch cortisol cho đường chuẩn

Chất gốc cortisol 1000 ng/mL được pha loãng bằng dung môi methanol:nước với tỷ lệ 45:55 theo thể tích để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ là 50, 100, 150, 200, 250 ng/mL.

2.2.3.2. Phân tích hàm lượng insulin

Sơ đồ xử lý mẫu máu để phân tích insulin được trình bày trên Hình 2.4.



Hình 2.4. Sơ đồ xử lý mẫu máu để phân tích hàm lượng insulin

a. Xử lý mẫu

Máu cá được đồng nhất trong dung dịch ethanol:H₂O:HCl (80:20:1,25, theo thể tích), ly tâm 6000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút để lấy dịch chiết. Phần cặn được chiết lần 2 với dung dịch ethanol: H₂O:HCl (60:40:1, theo thể tích), ly tâm 6000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Gộp dịch chiết sau hai lần ly tâm rồi điều chỉnh đến

pH = 8,0 sử dụng NH_3 . Ly tâm 6000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, lấy dịch chiết loại bỏ cặn. Thêm CH_2Cl_2 vào dịch chiết vừa loại bỏ cặn lắc đều và tách lấy pha nước loại bỏ pha hữu cơ. Pha nước được thêm NaCl nồng độ cao, ly tâm 6000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, thu dịch chiết, lọc qua màng lọc $0,22\ \mu\text{m}$ trước khi tiêm vào cột sắc ký [55].

b. Điều kiện phân tích sắc ký

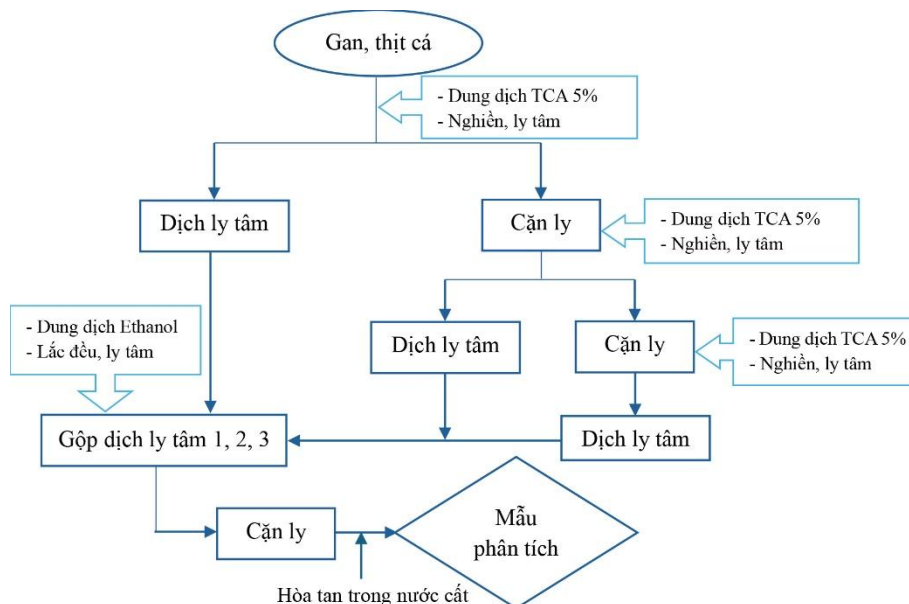
Cột sắc ký được sử dụng là hypersil BDS-C18, $125 \times 4,0\ \text{mm I.D}$, kích thước hạt $5\ \mu\text{m}$. Nhiệt độ trong cột là 30°C . Pha động được chọn là acetonitril: nước theo tỷ lệ tương ứng 50:50 (v/v). Tốc độ dòng $1,0\ \text{mL/phút}$. Thể tích tiêm mẫu là $20\ \mu\text{L}$. Đầu dò DAD lấy sắc đồ insulin tại bước sóng $274\ \text{nm}$.

c. Chuẩn bị dung dịch insulin cho đường chuẩn

Chất gốc insulin ($0,0303\ \text{g}$) được hòa tan trong $10\ \text{mL}$ dung dịch HCl $0,01\ \text{M}$ để thu được dung dịch gốc insulin $3,03\ \text{mg/mL}$. Pha loãng dung dịch gốc insulin $3,03\ \text{mg/mL}$ bằng dung dịch HCl $0,01\ \text{M}$ để thu được các dung dịch chuẩn trong phạm vi nồng độ từ $0,1515$, $0,303$, $1,515$ và $3,03\ \text{mg/L}$ (hoặc $151,5$; $303,0$, 1515 và $3030\ \text{ng/mL}$).

2.2.3.3. Phân tích hàm lượng glycogen

Sơ đồ xử lý mẫu gan cá để phân tích glycogen được trình bày trên Hình 2.5.



Hình 2.5. Sơ đồ xử lý mẫu gan cá để phân tích hàm lượng glycogen

a. Xử lý mẫu

Gan cá được nghiền với Trichloroacetic (TCA) 5 % trong 3 phút, ly tâm và lấy phần dịch nổi phía trên. Tiếp tục chiết bã gan cá thêm 2 lần nữa với TCA 5 %. Gộp dịch ly tâm sau 3 lần chiết. Thêm ethanol tuyệt đối vào dịch chiết, lắc đều, ly tâm

5000 vòng/phút trong 15 phút gạn lấy kết tủa. Hòa tan kết tủa trong nước cất ấm để phân tích hàm lượng glycogen trong gan cá [56].

b. Định lượng glycogen trong dịch chiết từ gan

Nguyên tắc phương pháp: Thuốc thử Iodine-Potassium Iodide (IKI) được thêm vào dịch chiết glycogen, lắc vortex để yên trong 20 phút và đo ở bước sóng 460 nm trên thiết bị quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis.

Chuẩn bị hóa chất:

Chuẩn bị dung dịch glycogen: Chất gốc D-glucose (0,05 g) được hòa tan trong 10 mL dung dịch Trichloroacetic acid (TCA) 5 % để thu được dung dịch glycogen chuẩn 500 mg/L (= 0,5 mg/mL).

Chuẩn bị dung dịch TCA 5 %: Hòa tan 5 g TCA trong 95 mL nước cất.

Chuẩn bị dung dịch KCl 25 %: Hòa tan 25 g KCl trong 75 mL nước cất.

Chuẩn bị thuốc thử Iodine-Potassium Iodide: Hòa tan 1,0 g I₂ và 2,0 g KI trong 20 mL nước cất, định mức bằng dung dịch KCl 25 % đến thể tích 100 mL.

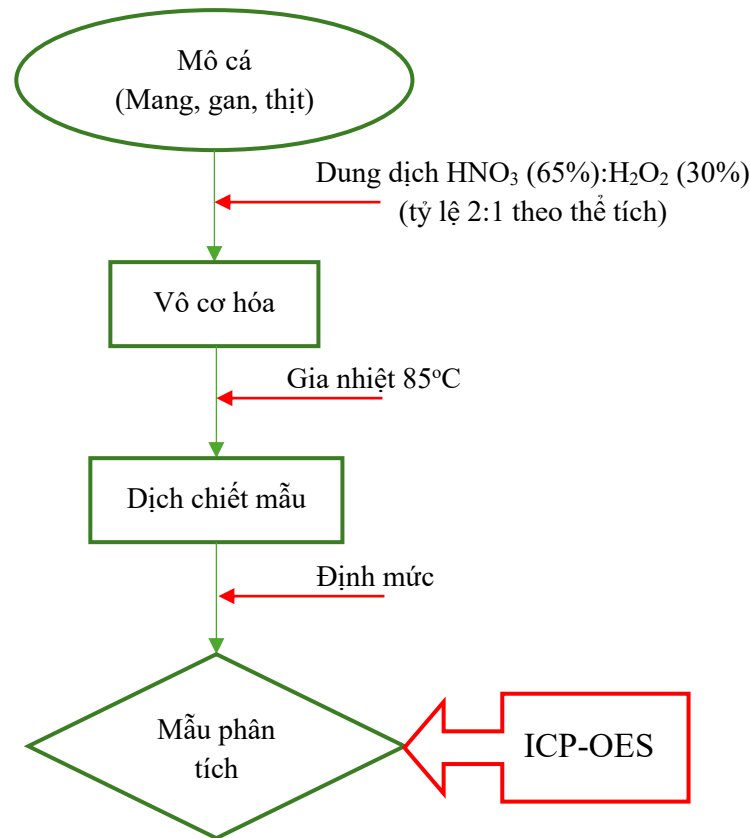
Chuẩn bị dung dịch glycogen cho đường chuẩn và trình tự phân tích: Pha một dãy 6 dung dịch glycogen chuẩn trong nước cất có nồng độ khoảng từ 10 - 140 mg/L. Dùng bình định mức 5 mL, lần lượt thêm vào các hóa chất như trong Bảng 2.1 và lắc bằng máy lắc vortex mixer VM-2000 sau đó để yên trong 20 phút trước khi đo bằng máy đo UV-Vis ở bước sóng 460 nm.

Bảng 2.1. Trình tự phân tích glycogen bằng thuốc thử IKI

Dung dịch	Bình 1	Bình 2	Bình 3	Bình 4	Bình 5	Bình 6	Bình 7
V _{glycogen} (0,5 mg/mL) (mL)	0	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,4
V _{H₂O} (mL)	5	4,8	4,7	4,4	3,9	3,7	3,5
V _{thuốc thử IKI} (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C _{glycogen} (mg/L)	0	10,0	20,0	50,0	100,0	120,0	140,0

2.2.3.4. Phân tích tổng hàm lượng Cd, Pb trong các mô cá

Sơ đồ xử lý mẫu mang, gan và thịt cá để phân tích tổng lượng Cd và Pb được trình bày trên Hình 2.6.



Hình 2.6. Sơ đồ xử lý mẫu để phân tích tổng lượng Cd và Pb trên thiết bị ICP-OES

Mẫu cá được vô cơ hóa với 6 mL hỗn hợp HNO₃ (65 %) và H₂O₂ (30 %) (2:1 theo thể tích) trong bình kín. Các mẫu được gia nhiệt đến 85°C trong 30 phút. Chất lỏng trong suốt được pha loãng với nước khử ion thành 25 mL. Phân tích Cd, Pb tổng số bằng thiết bị quang phổ phát xạ cảm ứng cao tần plasma ICP-OES Optima 2100DV – Perkin Elmer, các điều kiện vận hành được trình bày trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Các thông số vận hành phân tích Cd và Pb

Thông số	Giá trị tối ưu
Bước sóng	226, 502 nm đối với Cd 405, 781 nm đối với Pb
Công suất nguồn RF	1400 W
Lưu lượng khí tạo sol khí (nebulizer)	0,7 L/phút
Lưu lượng khí hỗ trợ (Auxiliary)	0,2 L/phút
Chế độ đo	Đọc trực
Tốc độ bơm mẫu	1,5 mL/phút
Lưu lượng khí plasma	15 L/phút
Acid nền	HNO ₃ 2 %

2.2.3.5. Giải phẫu mô học

Mẫu được thực hiện tại Trung tâm Công nghệ sinh học TP.HCM theo quy trình của đơn vị.

2.2.3.6. Thẩm định các phương pháp phân tích

Đường chuẩn tuyến tính (mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và tín hiệu) được thiết lập bằng cách sử dụng ít nhất bốn mẫu chuẩn và tính tuyến tính của nó được xác nhận dựa trên hệ số tương quan (r^2). Đường chuẩn được chấp nhận nếu $r^2 > 0,99$.

Theo hướng dẫn của ICH [57], giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định như sau:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a}$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn của tín hiệu mẫu trắng

a là hệ số góc của đường chuẩn tuyến tính ($y = ax + b$)

Độ chụm và độ chính xác được xác định dựa trên 2 nồng độ chất chuẩn khác nhau (trong phạm vi đường chuẩn), mỗi nồng độ chuẩn bị 6 mẫu khác nhau.

✚ Đánh giá độ chụm dựa trên độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) giữa 6 mẫu cho mỗi nồng độ. Công thức tính RSD như sau:

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \%$$

Trong đó: $SD = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{X_i - \bar{X}}{n-1}}$ n = 6 là số lần phân tích lặp lại

X_i giá trị các lần đo ($i = 1 - 6$)

$\bar{X}$ giá trị chính

✚ Đánh giá độ chính xác dựa trên độ lệch giữa nồng độ phân tích thực và nồng độ chất chuẩn. Công thức tính độ chính xác như sau:

$$\text{Độ chính xác (\%)} = \frac{\text{Nồng độ thực đo}}{\text{Nồng độ chất chuẩn}} \times 100 \%$$

- Hiệu suất thu hồi (H %) được xác định bằng cách thêm từng chất chuẩn (cortisol, insulin, glycogen, Pb, Cd) có nồng độ đã biết vào mẫu cần phân tích. Định lượng lặp lại 6 lần (n = 6) các mẫu có và không có thêm chuẩn, từ đó tính hiệu suất thu hồi theo công thức:

$$H(\%) = \frac{C_2 - C_x}{C_1} \times 100$$

Trong đó: C_x là nồng độ chất cần phân tích có trong mẫu;

C_1 là nồng độ chất chuẩn thêm vào trong mẫu;

C₂ là tổng nồng độ chất chuẩn thêm vào và chất cần phân tích trong mẫu.

2.2.4. Phân tích thống kê

Kết quả thực nghiệm được phân tích thống kê theo phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA), kiểm định LSD ở mức ý nghĩa $p \leq 0,05$, sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 22.0. Kết quả phân tích được biểu diễn bằng giá trị chính $\pm$ độ lệch chuẩn.

2.3. THIẾT BỊ - HÓA CHẤT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

Bảng 2.3. Dung môi, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên Hóa chất	Độ tinh khiết	Công ty sản xuất	Xuất xứ
1	Acid nitrite (HNO ₃)	65 %	Sigma Aldrich	Mỹ
2	Acid hydroclorit (HCl)	37 %	Sigma Aldrich	Mỹ
3	Acid trichloroacetic (C ₂ HCl ₃ O ₂)	≥ 99,50 %	Supelco	Mỹ
4	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	30 %	Sigma Aldrich	Mỹ
5	Chì acetate (Pb(CH ₃ COO) ₂ .3H ₂ O)	≥ 99,00 %	Sigma Aldrich	Mỹ
6	Cadimi clorua (CdCl ₂)	≥ 99,99 %	Sigma Aldrich	Mỹ
7	Kali hydroxit (KOH)	≥ 90,00 %	Sigma Aldrich	Mỹ
8	Ammonium chloride (NH ₄ Cl)	≥ 99,50 %	Sigma Aldrich	Mỹ
9	Canxi clorua (CaCl ₂)	≥ 96,00 %	Sigma Aldrich	Mỹ
10	Kali iodide (KI)	≥ 99,00 %	Sigma Aldrich	Mỹ
11	Iodine (I ₂)	≥ 99,80 %	Sigma Aldrich	Mỹ
12	Acetonitrile (CH ₃ CN)	≥ 99,90 %	Sigma Aldrich	Mỹ
13	Dichloromethane (CH ₂ Cl ₂)	≥ 99,80 %	Sigma Aldrich	Mỹ
14	Cortisol	≥ 98,00%	Sigma Aldrich	Mỹ
15	Insulin	≥ 98,00%	Sigma Aldrich	Mỹ
16	D-glucose	≥ 98,00 %	Sigma Aldrich	Mỹ

Bảng 2.4. Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên Thiết bị	Số hiệu	Công ty sản xuất	Xuất xứ
1	Hệ thống quang phổ phát xạ cảm ứng cao tần plasma ICP – OES Optima	2100DV	Perkin Elmer	Mỹ
2	Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với cột sắc ký	1200 series	Agilent – Waldbronn	Đức

<i>STT</i>	<i>Tên Thiết bị</i>	<i>Số hiệu</i>	<i>Công ty sản xuất</i>	<i>Xuất xứ</i>
	hypersil BDS-C18 và đầu dò DAD			
3	Máy quang phổ UV-Vis	Evolution 201	Thermo	Mỹ
4	Máy lắc đồng hóa mẫu (Vortex Mixer)	VM-2000		

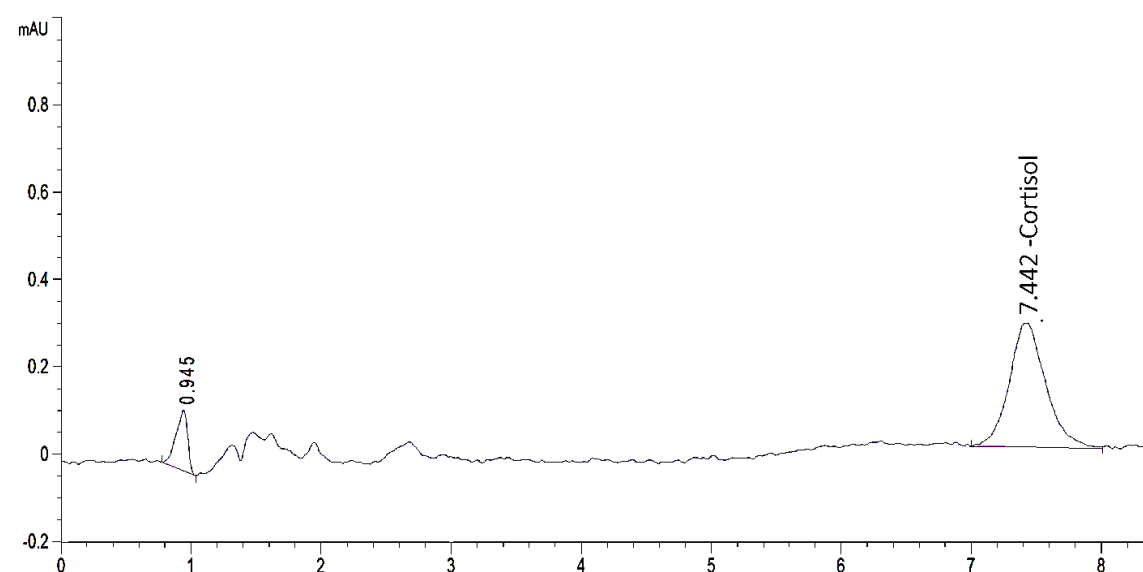
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. THẨM ĐỊNH CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

Để đảm bảo kết quả phân tích chính xác và đáng tin cậy, thẩm định phương pháp phân tích là một bước quan trọng. Một phương pháp phân tích được xác nhận là phù hợp với mục đích dự định, nghĩa là phương pháp này luôn tạo ra kết quả đáng tin cậy.

3.1.1. Thẩm định phương pháp định lượng cortisol

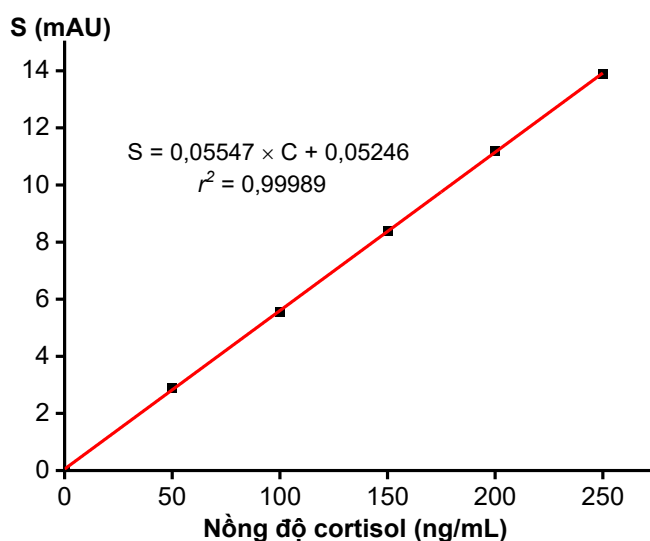
Trong quá trình phát triển và tối ưu hóa, một hệ thống HPLC đẳng dòng với pha động an toàn đã được sử dụng. Để xác định thời gian xuất hiện đỉnh hấp thu đặc trưng của cortisol tại bước sóng 254 nm, mẫu huyết tương chuẩn có thêm cortisol (50 μ L) được tiêm vào cột sắc ký hypersil BDS-C18, $125 \times 4,0$ mm I.D., kích thước hạt 5 μ m. Điều kiện sắc ký như sau: nhiệt độ cột là 36°C , pha động là methanol: nước (45:55 theo thể tích), tốc độ dòng 0,8 mL/phút. Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ xuất hiện một đỉnh sắc nét và đối xứng tại thời gian lưu là 7,442 phút (Hình 3.1). Ưu điểm của phương pháp này là pha động an toàn và thời gian lưu ngắn, khẳng định tính hiệu quả về chi phí để xác định nồng độ cortisol của phương pháp này so với công bố trước đây [58] (thời gian lưu cortisol là 9,0 phút sử dụng pha động acetonitrile:nước (28:72 v/v), tốc độ dòng 1,0 mL/phút).



Hình 3.1. Sắc ký đồ của cortisol trong huyết tương

Đường chuẩn cho cortisol được xây dựng và tuyến tính trong phạm vi từ 50 đến 250 ng/mL với hệ số xác định là 0,99989. Trên Hình 3.2 trình bày đồ thị đường chuẩn của cortisol. Giá trị LOD và LOQ của phương pháp này được tìm thấy lần lượt là 0,87 ng/mL và 2,65 ng/mL. Giá trị LOQ trong nghiên cứu này tương đương hoặc thấp hơn so với các công bố trước đây (dao động khoảng 2,5 - 5,0 ng/mL) [58-65].

Hai nồng độ cortisol khác nhau (50,0 và 98,8 ng/mL) trong phạm vi tuyến tính, trong đó sáu mẫu khác nhau cho mỗi nồng độ được chuẩn bị. Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của độ chụm trong ngày từ 0,91 – 1,70 % và RSD của độ chụm giữa các ngày từ 1,08 – 1,74 %. Độ đúng trong ngày từ 95,13 – 98,43 % và độ đúng giữa các ngày từ 94,64 – 95,55 %. Hiệu suất thu hồi cortisol được thực hiện mẫu huyết tương của cá rô đồng có thêm cortisol chuẩn có nồng độ 98,8 ng/mL (lặp lại 03 lần, $n = 3$). Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi đạt $97,90 \pm 1,08$ % với RSD là 1,11 %.

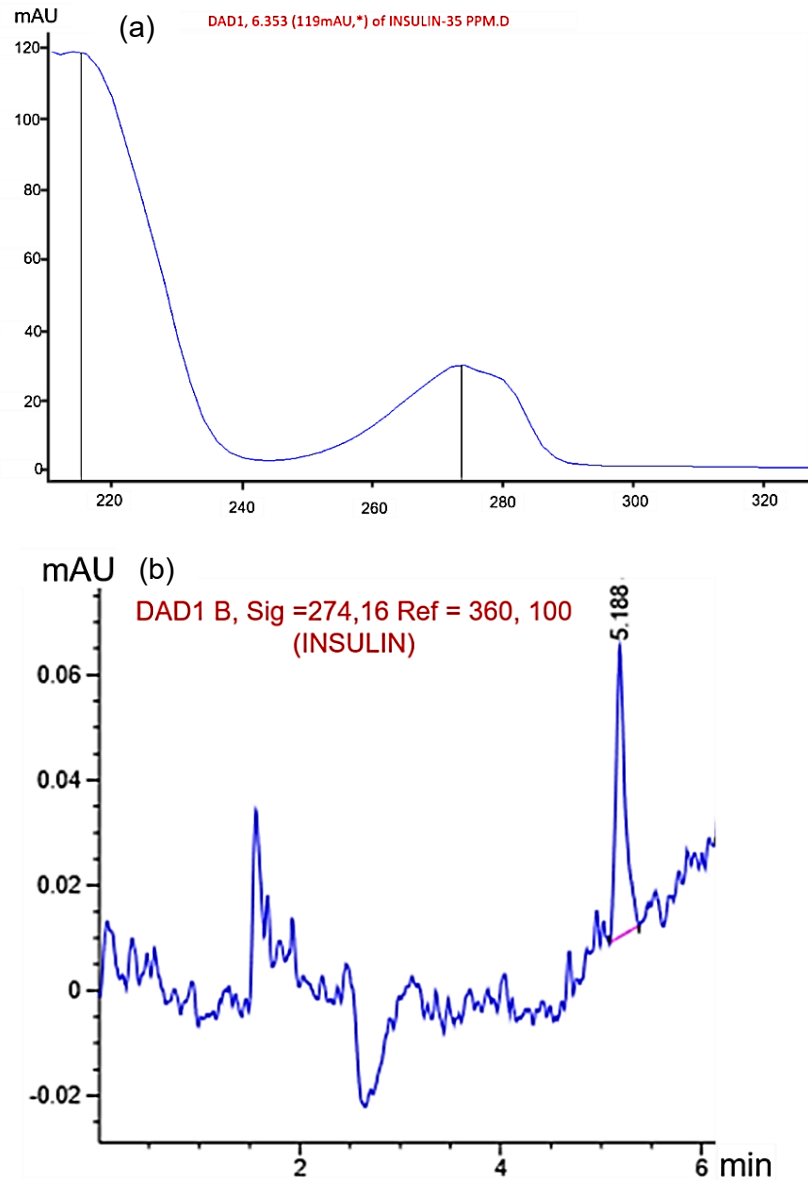


Hình 3.2. Đồ thị đường chuẩn cortisol

3.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng insulin

Giống như tất cả các phân tử lớn khác, insulin không dễ hình thành các đỉnh sắc ký sắc nét mà thường hình thành các đỉnh rộng có đuôi. Kết quả khảo sát cho thấy insulin có 02 đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 210 và 274 nm (Hình 3.3a). Thông thường, các peptit và protein thể hiện sự hấp thụ tối đa ở bước sóng khoảng 210 – 220 nm và gần 280 nm. Bước sóng khoảng 210 – 220 nm đặc trưng cho các liên kết peptit và bước sóng gần 280 nm thuộc về các acid amin thơm, tryptophan và tyrosine [66]. Cường độ hấp thụ thấp hơn ở 274 nm so với 210 nm là do trong insulin không có tryptophan và rất ít tyrosine. Bước sóng phát hiện 274 nm được chọn vì đỉnh hấp thụ tương đối sắc nét và ít bị ảnh hưởng bởi tạp chất. Trong quá trình phát triển và tối ưu hóa, một hệ thống HPLC đẳng dòng với pha động an toàn (độ mặn không cao, pH lớn hơn 2,5 và tốc độ dòng chảy chấp nhận được) đã được sử dụng. Dung dịch mẫu chứa insulin (20 μ L) được tiêm vào cột sắc ký hypersil BDS-C18, 125 $\times$ 4,0 mm I.D., kích thước hạt 5 μ m. Điều kiện sắc ký như sau: tốc độ dòng là 1,0 mL/phút, rửa giải đẳng dòng, pha động là acetonitril-nước (50:50, v/v). Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ

xuất hiện một đỉnh sắc nét và đối xứng tại thời gian lưu là 5,188 phút (Hình 3.3b). Ưu điểm của phương pháp này là pha động an toàn (không ảnh hưởng đến áp suất cột) và thời gian lưu ngắn, điều này khẳng định tính hiệu quả về mặt chi phí trong việc xác định nồng độ insulin của phương pháp này so với các công bố nghiên cứu trước đây [67, 68].

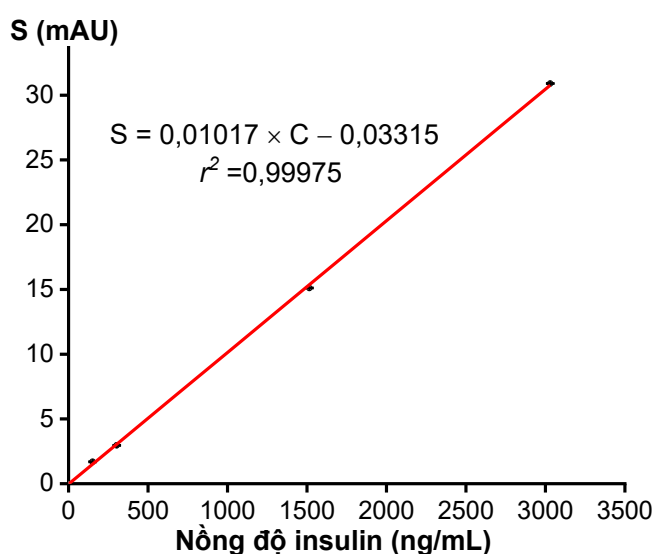


Hình 3.3. (a) Phổ hấp thụ của insulin và (b) Sắc ký đồ của insulin trong mẫu dịch chiết từ máu cá

Đường chuẩn cho insulin được xây dựng và tuyến tính trong phạm vi từ 151,5 đến 3030 ng/mL với hệ số xác định là 0,99975 (Hình 3.4). Giá trị LOD và LOQ của phương pháp này được tìm thấy lần lượt là 11,0 và 32,0 ng/mL, thấp hơn nhiều so với phạm vi làm việc đối với insulin (tức là 151,5 và 3030 ng/mL). Giá trị LOD của phương pháp này thấp hơn so với các công bố trước đây (dao động từ 100 đến 2930

ng/mL) [66-68] điều này cho thấy phương pháp này nhạy hơn so với các nghiên cứu trước đây.

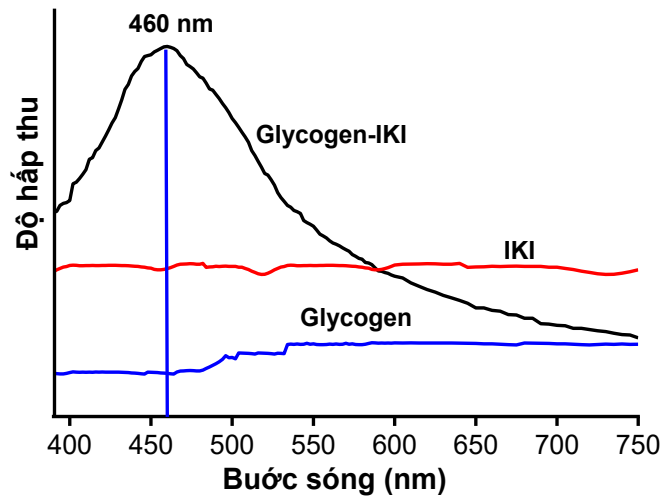
Hai nồng độ insulin khác nhau (303,0 và 1515,0 ng/mL) trong phạm vi tuyến tính, trong đó sáu mẫu khác nhau cho mỗi nồng độ được chuẩn bị trong 0,01 M HCl. Kết quả cho thấy RSD của độ chụm trong ngày từ 1,93 – 4,20 % và RSD của độ chụm giữa các ngày từ 1,57 – 4,17 %. Độ đúng trong ngày từ 95,97 – 99,18 % và độ đúng giữa các ngày từ 96,67– 97,76 %. Hiệu suất thu hồi insulin được thực hiện mẫu dịch chiết của máu cá rô đồng có thêm insulin chuẩn có nồng độ 1515,0 ng/mL (thí nghiệm được lặp lại 3 lần, $n = 3$). Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi đạt $98,00 \pm 1,34$ % với % RSD là 1,37 %.



Hình 3.4. Đồ thị đường chuẩn insulin

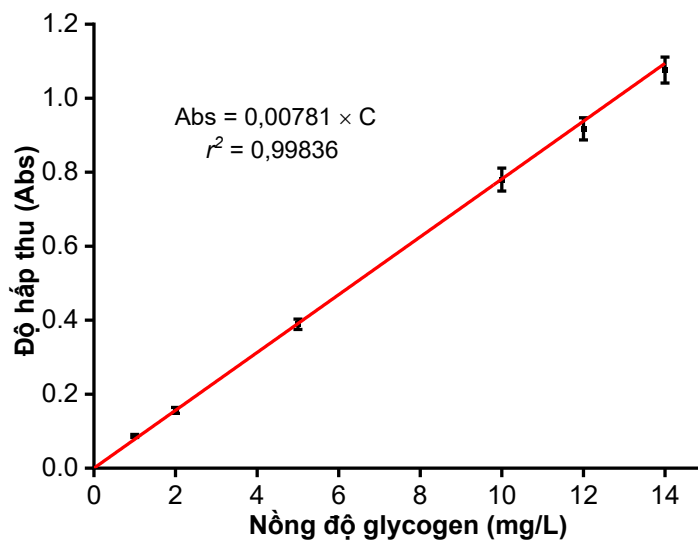
3.1.3. Thẩm định phương pháp định lượng glycogen

Phát triển và tối ưu hóa phương pháp dựa trên khả năng tạo phức màu nâu đỏ giữa các sản phẩm thủy phân từ glycogen với IKI. Phổ UV-Vis của tác chất glycogen, IKI và glycogen-IKI (100 μ L dung dịch glycogen 0,5 mg/mL và 100 μ L dung dịch IKI lắc vortex, để yên trong 20 phút) được trình bày trên Hình 3.5. Dung dịch glycogen và IKI không có đỉnh hấp thụ ở vùng nhìn thấy (400 – 750 nm), trong khi dung dịch glycogen-IKI xuất hiện một đỉnh hấp thụ trong vùng ánh sáng nhìn thấy (460 nm), khẳng định đã có phản ứng hóa học giữa glycogen và IKI. Kết quả này phù hợp với kết quả đã được L.W.Bennett và cộng sự công bố vào năm 2007 [69].



Hình 3.5. Bước sóng hấp thu của glycogen-IKI

Đường chuẩn cho glycogen được xây dựng và tuyến tính trong phạm vi từ 10,0 đến 140,0 mg/L với hệ số xác định là 0,99836 (Hình 3.6). Giá trị LOD và LOQ của phương pháp này được tìm thấy lần lượt là 1,187 và 3,598 mg/L, thấp hơn nhiều so với phạm vi làm việc đối với glycogen (tức là 10,0 và 140,0 mg/L).



Hình 3.6. Đồ thị đường chuẩn glycogen

Hai nồng độ glycogen khác nhau (10,0 và 50,0 mg/L) trong phạm vi tuyến tính, trong đó sáu mẫu khác nhau cho mỗi nồng độ được chuẩn bị trong TCA 5 %. Kết quả cho thấy RSD của độ chụm trong ngày từ 2,82 – 5,06 % và RSD của độ chụm giữa các ngày từ 1,89 – 4,05 %. Độ đúng trong ngày từ 96,88 – 99,02 % và độ đúng giữa các ngày từ 95,39 – 96,67 %. Hiệu suất thu hồi glycogen được thực hiện mẫu dịch chiết gan của cá rô đồng có thêm glycogen chuẩn có nồng độ 10 mg/L (lặp lại 3 lần, $n = 3$). Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi đạt $93,70 \pm 1,39$ % với RSD là 1,48%.

3.1.4. Thẩm định phương pháp định lượng Pb và Cd tại mang, gan và thịt cá rô đồng

Bảng 3.1 trình bày tóm tắt các thông số thẩm định phương pháp phân tích Pb và Cd trên thiết bị quang phổ phát xạ cao tần plasma (ICP-OES Optima 2100 DV, Perkin Elmer).

Bảng 3.1. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích Pb, Cd

Thông số	Mẫu	Kết quả	
		Pb	Cd
Khoảng tuyến tính (mg/L)		0,01 – 100	0,002 – 200
Đường chuẩn (mg/L)		0,02 – 0,50	0,005 – 0,200
Phương trình hồi quy		$y = 644,6x - 1388$	$y = 1864,9x + 44,7$
Hệ số tương quan (r^2)		0,9998	0,9999
LOD ($\mu\text{g/L}$)		1,20	0,52
LOQ ($\mu\text{g/L}$)		3,90	1,73
RSD của độ chụm (%)	Mang	4,40 %	9,00 %
	Gan	3,70 %	6,10 %
	Thịt	4,30 %	8,20 %
Hiệu suất thu hồi (H%)		92,20 %	94,40 %

Nhìn chung độ chụm, hiệu suất thu hồi của các phương pháp phân tích Cd, Pb, cortisol, insulin và glycogen đều ở trong khoảng chấp nhận theo AOAC. Tóm tắt các thông số thẩm định các phương pháp phân tích được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Các thông số của phương pháp phân tích

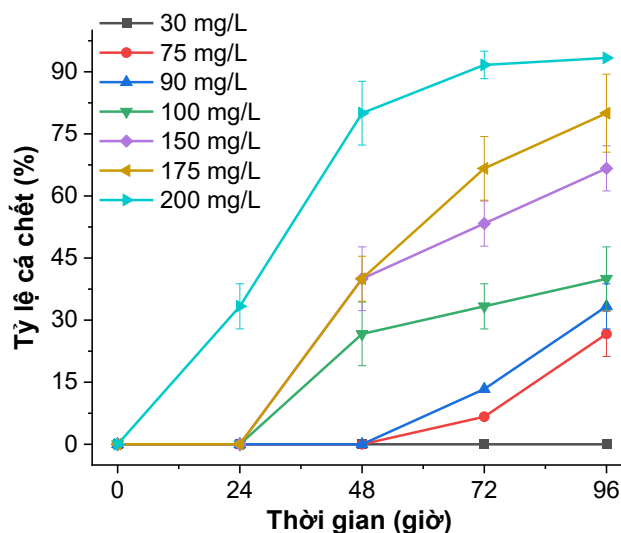
<i>TT</i>	<i>Thông số</i>	<i>Kết quả</i>				
		<i>Phương pháp phân tích cortisol</i>	<i>Phương pháp phân tích insulin</i>	<i>Phương pháp phân tích glycogen</i>	<i>Phương pháp phân tích Pb</i>	<i>Phương pháp phân tích Cd</i>
1	Thời gian lưu	7,442 phút	5,188 phút	-	-	-
2	Phương trình đường chuẩn	$y = 0,05547x + 0,05246$	$y = 0,01017x - 0,03315$	$y = 0,00781x$	$y = 644,6x - 1388$	$y = 1864,9x + 44,7$
3	Hệ số tương quan (r^2)	0,9999	0,9998	0,9984	0,9998	0,9999
4	LOD	0,870 ng/mL	0,011 ng/mL	1,187 mg/L	1,200 µg/L	0,520 µg/L
5	LOQ	2,650 ng/mL	0,032 ng/mL	3,598 mg/L	3,900 µg/L	1,730 µg/L
6	Độ chụm trong ngày (%RSD)	0,91 – 1,70 %	1,93 – 4,20%	2,82 – 5,06 %	-	-
7	Độ chụm giữa các ngày (%RSD)	1,08 – 1,74 %	1,57 – 4,17 %	1,89 – 4,05 %	-	-
8	Độ đúng trong ngày (%RSD)	95,13 – 98,43 %	95,97 – 99,18 %	96,88 – 99,02 %	-	-
9	Độ đúng giữa các ngày (%RSD)	94,64 – 95,55 %	96,67 – 97,76 %	95,39 – 96,67 %	-	-
10	Hiệu suất thu hồi	97,90%	98,15%	93,70%	92,20%	94,40%

3.2. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHÌ (Pb) ĐẾN CÁ RÔ ĐỒNG (*Anabas testudineus*)

3.2.1. Nghiên cứu ngưỡng độc cấp tính của Pb

3.2.1.1. Nồng độ Pb gây chết cá thí nghiệm trong 96 giờ (LC_{50} trong 96 giờ)

Độc cấp tính của Pb đối với cá rô đồng được đánh giá thông qua số lượng cá chết trong 96 giờ và kết quả được trình bày trên Hình 3.7 và trong Phụ lục 22.



Hình 3.7. Tỷ lệ chết của cá rô đồng sau 96 giờ tiếp xúc với Pb

Kết quả thí nghiệm trên Hình 3.7 cho thấy:

+ Không có cá chết trong 96 giờ thí nghiệm đối với bể thí nghiệm ô nhiễm Pb 30 mg/L.

+ Đối với bể thí nghiệm ô nhiễm Pb 75 – 90 mg/L, không có cá chết trong 48 giờ đầu của thí nghiệm. Kéo dài thời gian tiếp xúc đến 96 giờ, lượng cá chết khoảng $26,67 \pm 5,44$ % đối với Pb 75 mg/L và $33,33 \pm 5,44$ % đối với Pb 90 mg/L.

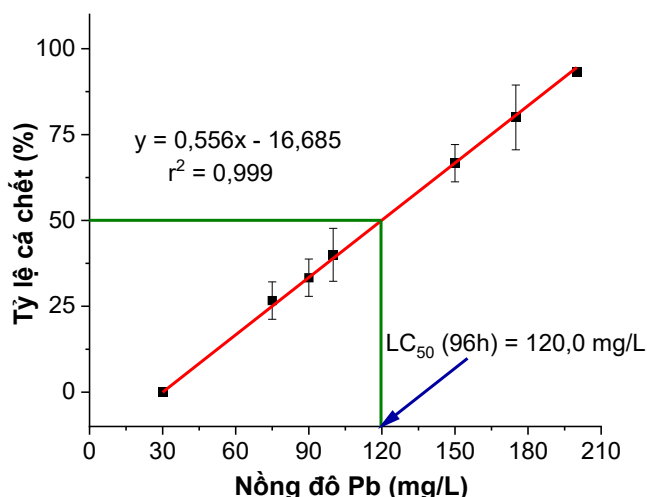
+ Không có cá chết trong 24 giờ đầu tiên đối với bể thí nghiệm ô nhiễm Pb 100 – 175 mg/L, tuy nhiên kéo dài thời gian tiếp xúc đã gây độc cho cá. Tỷ lệ cá chết trong 96 giờ là $40,00 \pm 7,70$ % đối với Pb 100 mg/L; $66,67 \pm 5,44$ % đối với Pb 150 mg/L và $80,00 \pm 9,43$ % đối với Pb 175 mg/L.

+ Đối với bể thí nghiệm ô nhiễm Pb 200 mg/L, khoảng $33,33 \pm 5,44$ % lượng cá thí nghiệm chết trong 24 giờ đầu tiên và tỷ lệ cá chết tăng lên đến $80,00 \pm 7,70$ % trong 48 giờ. Đến 96 giờ, tỷ lệ cá chết khoảng $93,33 \pm 0,00$ %.

+ Không xảy ra hiện tượng cá chết ở các thí nghiệm đối chứng.

3.2.1.2. Ước tính ngưỡng độc cấp tính LC_{50} trong 96 giờ

Đồ thị tương quan giữa tỷ lệ cá chết và nồng độ Pb trong nước được trình bày trên Hình 3.8.



Hình 3.8. Ngưỡng độc cấp tính của Pb (LC_{50} 96 giờ) đối với cá rô đồng

Phương trình tuyến tính tương quan giữa nồng độ Pb trong nước và tỷ lệ cá thí nghiệm chết là $y = 0,556x - 16,685$ với hệ số tương quan $r^2 = 0,999$. Ngưỡng độc cấp tính của Pb (LC_{50} trong 96 giờ) đối với cá rô đồng tìm được là 120 mg/L. Ngưỡng độc cấp tính của Pb đối với các loài cá khác nhau thì rất khác nhau. Giá trị LC_{50} 96 giờ của Pb đối với cá ngựa vằn (*Danio rerio*) (kích thước $3,0 \pm 0,2$ cm) là $28,62 \pm 2,70$ mg/L [70], cá bơn (*Platichthys stellatus*) (kích thước $14,0 \pm 0,9$ cm) là 227,0 mg/L [71], cá đối đầu dẹt (*Mugil cephalus*) là 18,7 mg/L [72], cá chép (*Cyprinus carpio*) là 350 mg/L [73] và ở đối với cá điêu hồng (*Oreochromis SP.*) thì LC_{50} là 3,24 mg/L [74].

3.2.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Pb đối với cá rô đồng

Để nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Pb đối với cá rô đồng, nồng độ Pb ô nhiễm được chọn bằng $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$ giá trị LC_{50} 96 giờ tương ứng với nồng độ Pb 20, 30 và 40 mg/L và ký hiệu lần lượt là 20Pb, 30Pb và 40Pb.

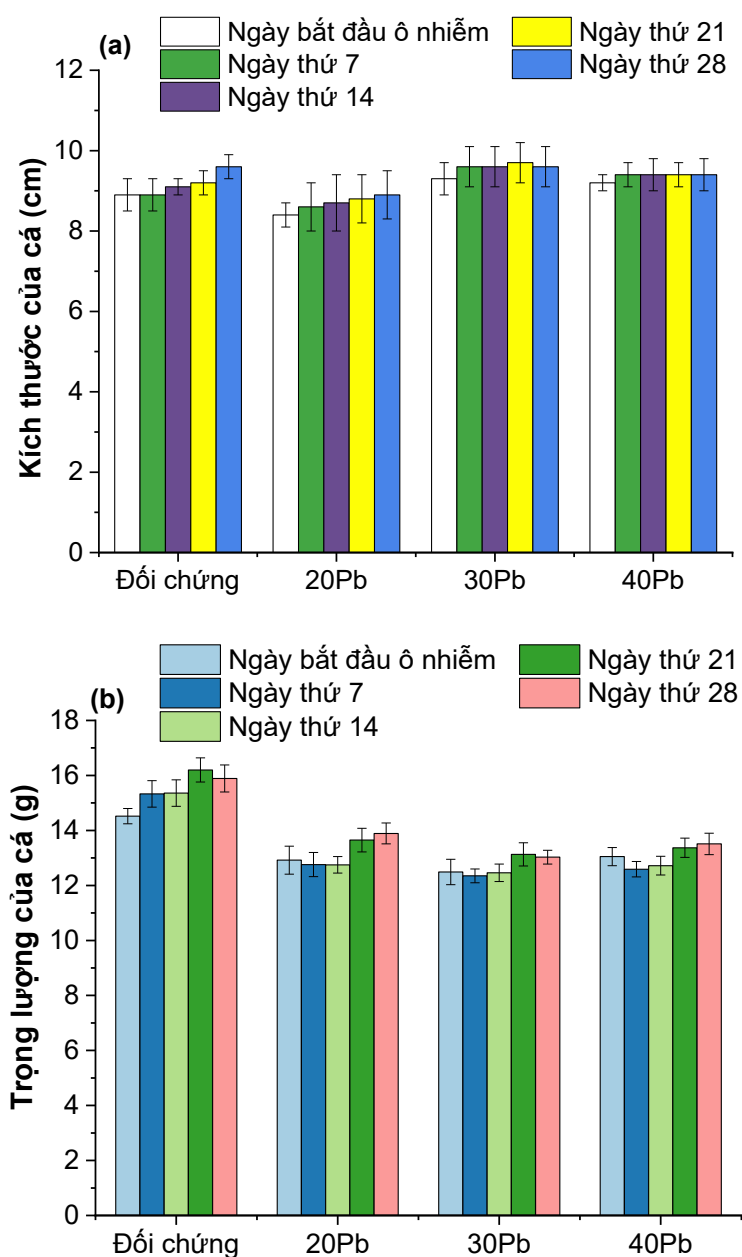
3.2.2.1. Cá rô đồng phơi nhiễm Pb

a. Tác động độc tính bán trường diễn của Pb lên sự tăng trưởng và phát triển của cá rô đồng

Sự thay đổi kích thước và trọng lượng của cá rô đồng đối chứng và cá sống trong nước ô nhiễm Pb được trình bày trên Hình 3.9 và trong kết quả thực nghiệm theo Phụ lục 23.

Trong quá trình phơi nhiễm (28 ngày), cá đối chứng (cá sống trong nước sạch) phản ứng nhanh, linh hoạt và ăn tốt. Cá phơi nhiễm Pb, ban đầu có nhiều hành động bất thường như quá kích động, nhảy ra khỏi môi trường thử nghiệm, chuyển động giật cục, bơi ngang và mất thăng bằng. Sau 3 ngày phơi nhiễm, cá trở nên kém linh hoạt, phản ứng chậm, mệt mỏi và giảm ăn đáng kể. Những hành vi bất thường tương tự cũng được quan sát thấy ở cá măng sữa (*Chanos chanos*) và cá rô đồng (*Anabas testudineus*)

phơi nhiễm Pb [75, 76]. Cá phơi nhiễm Pb nồng độ cao hơn thì phản ứng chậm hơn và ăn ít hơn. Kích thước của cá đối chứng đo được ở ngày ngày bắt đầu gây ô nhiễm là $8,9 \pm 0,4$ cm và ngày thứ 28 là $9,6 \pm 0,3$ cm, cho thấy kích thước của cá đối chứng tăng 8,2 % sau 28 ngày thí nghiệm. Tác động của Pb đến sự phát triển kích thước của cá rô đồng tương đối rõ. So với ban đầu, kích thước cá ô nhiễm Pb sau 28 ngày, tăng 6,0 % đối với bể 20Pb; 3,2 % đối với bể 30Pb và 2,5 % đối với bể 40Pb (Hình 3.9a). Kích thước cá ô nhiễm Pb tăng ít hơn so cá đối chứng, điều này có thể là do cá mệt mỏi, biếng ăn dẫn đến phát triển kém.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của Pb đến sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng

So với ngày bắt đầu thí nghiệm, trọng lượng của cá đối chứng sau 28 ngày tăng 9,44 % (trọng lượng ban đầu của cá đối chứng là $14,52 \pm 0,28$ g và ngày thứ 28 là $15,89 \pm 0,49$ g) (Hình 3.9b). Tương tự như kích thước, trọng lượng của cá ô nhiễm Pb sau 28 ngày tăng tương đối ít. So với ban đầu, trọng lượng cá ngày thứ 28 tăng 7,51 % đối với bể 20Pb; 4,32 % đối với bể 30Pb và 3,52 % đối với bể 40Pb.

b. Tác động độc tính bán trường diễn của Pb đến quy luật tích lũy Pb trong cá rô đồng

Kết quả tích lũy của Pb tại mang, gan và thịt cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb được trình bày trên Hình 3.10 và kết quả thực nghiệm trong Phụ lục 24, 25, 26.

Do tích tụ sinh học, hàm lượng kim loại nặng tại các bộ phận cơ thể của cá có thể tăng nhanh trong thời gian ngắn. Sự tích tụ kim loại nặng ở các mô cá phụ thuộc vào tính chất của kim loại, nồng độ và thời gian tiếp xúc với kim loại, nhiệt độ nước, độ tuổi của cá và hoạt động trao đổi chất của cá [77]. Kết quả trên Hình 3.10 cho thấy, tích lũy Pb ở mang, gan và thịt cá rô đồng phơi nhiễm Pb cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Mức độ tích lũy Pb tại các bộ phận cơ thể của cá rô đồng phụ thuộc vào nồng độ Pb trong nước và thời gian tiếp xúc, khi nồng độ Pb trong nước càng cao và thời gian phơi nhiễm càng dài thì lượng Pb tích lũy ở mang, gan và thịt cá càng nhiều.

Hàm lượng Pb tìm thấy trong cá đối chứng từ $20,67 \pm 2,98$ đến $20,90 \pm 1,92$ mg/kg mang khô, $0,56 \pm 0,11$ đến $0,58 \pm 0,14$ mg/kg gan khô và $0,56 \pm 0,09$ đến $0,60 \pm 0,15$ mg/kg thịt khô.

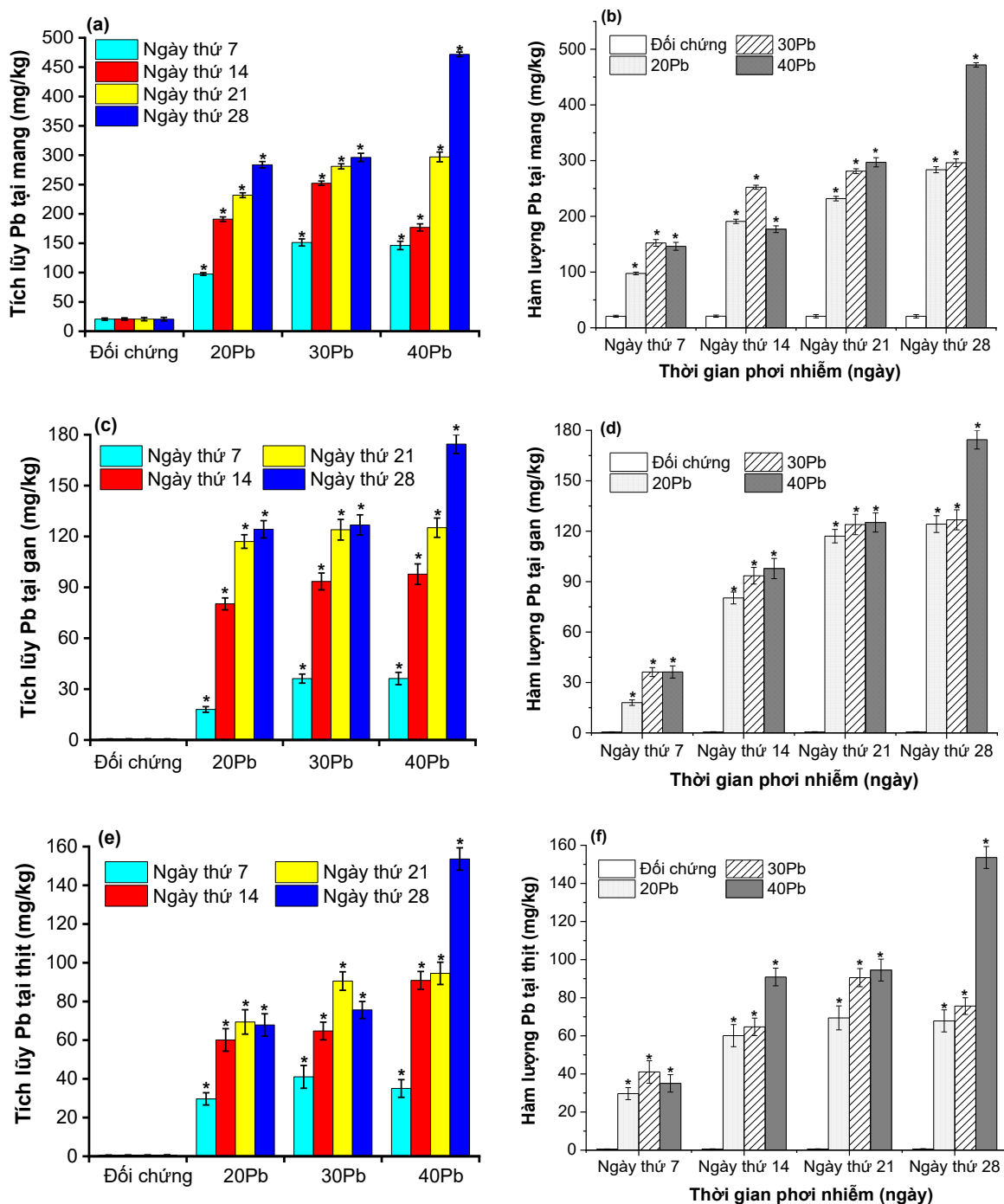
Tích tụ Pb tại mang: Ở mang cá rô đồng, tích lũy Pb được tìm thấy thấp nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L ($97,57 \pm 2,33$ mg/kg mang khô) ở ngày thứ 7 và cao nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm Pb 40 mg/L ($471,84 \pm 3,92$ mg/kg mang khô) ở ngày thứ 28 (Hình 3.10 a&b).

+ Đối với nhóm cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L, sự tích tụ Pb ở mang được tìm thấy là $97,57 \pm 2,33$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 7; $191,05 \pm 3,90$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 14; $231,81 \pm 4,09$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 21 và $283,71 \pm 5,39$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 28. Lượng Pb tại mang của nhóm cá này cao hơn từ 4,72 đến 13,73 lần so với cá đối chứng.

+ Vào các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, lượng Pb tích tụ tại mang của nhóm cá phơi nhiễm Pb 30 mg/L đo được lần lượt là $151,35 \pm 6,01$; $252,25 \pm 3,58$; $281,05 \pm 4,38$ và $296,22 \pm 7,03$ mg/kg mang khô. So với cá đối chứng, lượng Pb tại mang của nhóm cá này cao hơn từ 7,32 – 14,33 lần.

+ Hàm lượng Pb ở mang của nhóm cá phơi nhiễm Pb 40 mg/L đo được là $146,27 \pm 7,13$; $176,98 \pm 6,06$; $297,06 \pm 8,28$ và $471,84 \pm 3,92$ mg/kg mang khô tương

ứng với các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu thí nghiệm. Tích lũy Pb tại mang của nhóm cá này cao hơn từ 7,07 – 22,73 lần so với cá đối chứng.



Hình 3.10. Tích lũy lượng Pb ở cá rô đồng (a & b) mang, (c & d) gan và (e & f) thịt (Giá trị chính ± độ lệch chuẩn, n=3);

* Tích lũy Pb tại mang/gan/thịt cá phơi nhiễm Pb cao hơn đáng kể so với cá đối chứng ($p < 0,05$)

Tích tụ Pb tại gan: Hình 3.10 c&d cho thấy, sự tích tụ Pb tại gan cá rô đồng được tìm thấy thấp nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm 20Pb ($18,00 \pm 1,65$ mg/kg gan khô) ở ngày thứ 7 và cao nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm 40Pb ($174,45 \pm 5,55$ mg/kg gan khô) ở ngày thứ 28.

+ Kết quả thí nghiệm cho thấy, sự tích tụ Pb tại gan của nhóm cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L đo được ở các ngày thứ 7; 14; 21 và 28 lần lượt là $18,00 \pm 1,65$; $80,27 \pm 3,51$; $117,04 \pm 4,00$ và $124,23 \pm 5,09$ mg/kg gan khô, cao hơn so với cá đối chứng từ 31,96 đến 215,43 lần.

+ Đối với nhóm cá phơi nhiễm Pb 30 mg/L, sự tích tụ Pb tại gan được tìm thấy là $36,19 \pm 2,67$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 7; $93,48 \pm 4,95$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 14; $123,97 \pm 6,05$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 21 và $126,77 \pm 5,97$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 28. Lượng Pb ở gan nhóm của nhóm cá này cao hơn so với cá đối chứng từ 64,24 đến 219,83 lần.

+ Vào các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, lượng Pb tích tụ tại gan của cá rô đồng phơi nhiễm Pb 40 mg/L được tìm thấy lần lượt là $36,26 \pm 3,63$; $97,80 \pm 6,03$; $125,16 \pm 5,69$ và $174,45 \pm 5,55$ mg/kg gan khô, cao hơn từ 64,37 đến 302,51 lần so với cá đối chứng.

Tích tụ Pb tại thịt: Hàm lượng kim loại nặng tích tụ trong cơ thể cá có liên quan đến nồng độ kim loại nặng trong nước. Giống như mang và gan, sự tích tụ Pb tại thịt của cá rô đồng được tìm thấy thấp nhất đối với nhóm cá 20Pb ($29,67 \pm 3,15$ mg/kg thịt khô) ở ngày thứ 7 và cao nhất đối với nhóm cá 40Pb ($153,60 \pm 5,78$ mg/kg thịt khô) ở ngày thứ 28 (Hình 3.10 e&f).

+ Đối với nhóm cá 20Pb, sự tích tụ Pb tại thịt được tìm thấy là $29,67 \pm 3,15$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 7; $60,09 \pm 5,82$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 14; $69,40 \pm 6,30$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 21 và $67,83 \pm 5,79$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 28. Tích tụ Pb ở thịt của nhóm cá này cao hơn từ 52,98 đến 117,63 lần so với cá đối chứng.

+ Sự tích tụ Pb tại thịt của nhóm cá 30Pb đo được ở các ngày thứ 7; 14; 21 và 28 lần lượt là $41,04 \pm 5,90$; $64,72 \pm 4,58$; $90,54 \pm 4,77$ và $75,61 \pm 4,39$ mg/kg thịt khô, cao hơn từ 73,28 đến 153,45 lần so với cá đối chứng.

+ Vào các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, lượng Pb tích tụ ở thịt của nhóm cá 40Pb được tìm thấy lần lượt là $35,05 \pm 4,57$; $90,87 \pm 4,63$; $94,51 \pm 5,76$ và $153,60 \pm 5,78$ mg/kg thịt khô, cao hơn từ 62,58 đến 254,58 lần so với cá đối chứng.

Bảng 3.3 trình bày kết quả so sánh sự tích tụ Pb giữa mang – gan, mang – thịt và gan – thịt. Kết quả trong Bảng 3.3 cho thấy Pb tập trung ở mang cá rô đồng nhiều hơn so với gan và thịt.

Bảng 3.3. Tỷ lệ về hàm lượng Pb tích lũy tại mang – gan, mang – thịt và gan – thịt

		Đối chứng	20Pb	30Pb	40Pb
Tỷ lệ $\text{Pb}_{\text{mang}}/\text{Pb}_{\text{gan}}$	Ngày thứ 7	36,7	5,4	4,2	4,0
	Ngày thứ 14	36,5	2,4	2,7	1,8
	Ngày thứ 21	35,7	2,0	2,3	2,4
	Ngày thứ 28	35,8	2,3	2,3	2,7
Tỷ lệ $\text{Pb}_{\text{mang}}/\text{Pb}_{\text{thịt}}$	Ngày thứ 7	36,9	3,3	3,7	4,2
	Ngày thứ 14	36,5	3,2	3,9	1,9
	Ngày thứ 21	35,1	3,3	3,1	3,1
	Ngày thứ 28	34,3	4,3	3,9	3,1
Tỷ lệ $\text{Pb}_{\text{gan}}/\text{Pb}_{\text{thịt}}$	Ngày thứ 7	1,0	0,6	0,9	1,0
	Ngày thứ 14	1,0	1,3	1,4	1,1
	Ngày thứ 21	1,0	1,7	1,4	1,3
	Ngày thứ 28	1,0	1,8	1,7	1,1

+ So sánh sự tích tụ Pb giữa mang và gan của nhóm cá đối chứng, kết quả cho thấy Pb tập trung ở mang nhiều hơn gan từ 35,7 đến 36,7 lần. Lượng Pb ở mang cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L cao hơn so với gan cá từ 2,0 đến 5,4 lần. Ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm, Pb tập trung ở mang cao gấp 5,4 lần so với Pb tập trung ở gan. Kéo dài thời gian phơi nhiễm đến ngày thứ 21, tích lũy Pb ở mang cao gấp 2 lần so với tích lũy Pb ở gan. Tại ngày thứ 28, thì tỷ lệ $\text{Pb}_{\text{mang}}/\text{Pb}_{\text{gan}}$ là 2,3. Ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm Pb 30 mg/L, lượng Pb tập trung tại mang cao gấp 4,2 lần so với lượng Pb tập trung ở gan. Kéo dài thời gian phơi nhiễm đến ngày thứ 14 và ngày thứ 28, lượng Pb ở mang cao gấp 2,7 lần và 2,3 lần so với lượng Pb tại gan. Đối với nhóm cá rô đồng phơi nhiễm Pb 40 mg/L, lượng Pb tích tụ tại mang cá đo được tại ngày thứ 7 cao gấp 4,2 lần so với lượng Pb tích tụ tại gan. Kéo dài đến ngày thứ 28, lượng Pb tích tụ ở mang cao gấp 2,7 lần so với lượng Pb tích tụ ở gan. Tỷ lệ $\text{Pb}_{\text{mang}}/\text{Pb}_{\text{gan}}$ của các nhóm phơi nhiễm Pb đạt cao nhất vào ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm và sau đó giảm rõ rệt.

Sự giảm tỷ lệ $\text{Pb}_{\text{mang}}/\text{Pb}_{\text{gan}}$ sau 7 ngày phơi nhiễm có thể liên quan đến mang cá. Do mang cá là cơ quan đa chức năng và thiết yếu, bao gồm hô hấp, điều hòa thẩm thấu, cân bằng acid-bazơ,... Bề mặt mang được phủ một lớp chất nhầy bảo vệ, bao gồm

glycoprotein, mucopolysaccharide, hợp chất có trọng lượng phân tử thấp và nước, chất nhầy này có thể chứa nhiều thành phần bề mặt mang tích điện âm [78], vì vậy, mang cá trở thành mục tiêu chính của các cation kim loại trong nước, điều này giải thích cho sự tích tụ Pb ở mang cao gấp nhiều lần (4,0 – 5,4 lần) so với gan trong 7 ngày đầu tiên. Tuy nhiên, tiếp xúc lâu dài với Pb ở nồng độ cao đã phá vỡ chức năng mang, cho phép Pb xâm nhập vào cơ thể và tích tụ trong các cơ quan khác, điều này giải thích sự giảm đáng kể tỷ lệ $\frac{Pb_{mang}}{Pb_{gan}}$ sau 7 ngày.

+ So sánh sự tích tụ Pb giữa mang và thịt của nhóm cá đối chứng, kết quả cho thấy Pb tập trung ở mang nhiều hơn thịt từ 34,3 đến 36,9 lần. Kết quả trong bảng 3.6 cho thấy, lượng Pb tập trung tại mang cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L cao hơn so với thịt cá từ 3,2 đến 4,3 lần. Đối với nhóm phơi nhiễm Pb 30 mg/L, lượng Pb tập trung tại mang cao gấp từ 3,1 – 3,9 lần so với lượng Pb tập trung ở thịt. Lượng Pb tích tụ ở mang cá phơi nhiễm Pb 40 mg/L cao gấp từ 1,9 đến 4,2 lần so với lượng Pb tích tụ ở thịt cá phơi nhiễm.

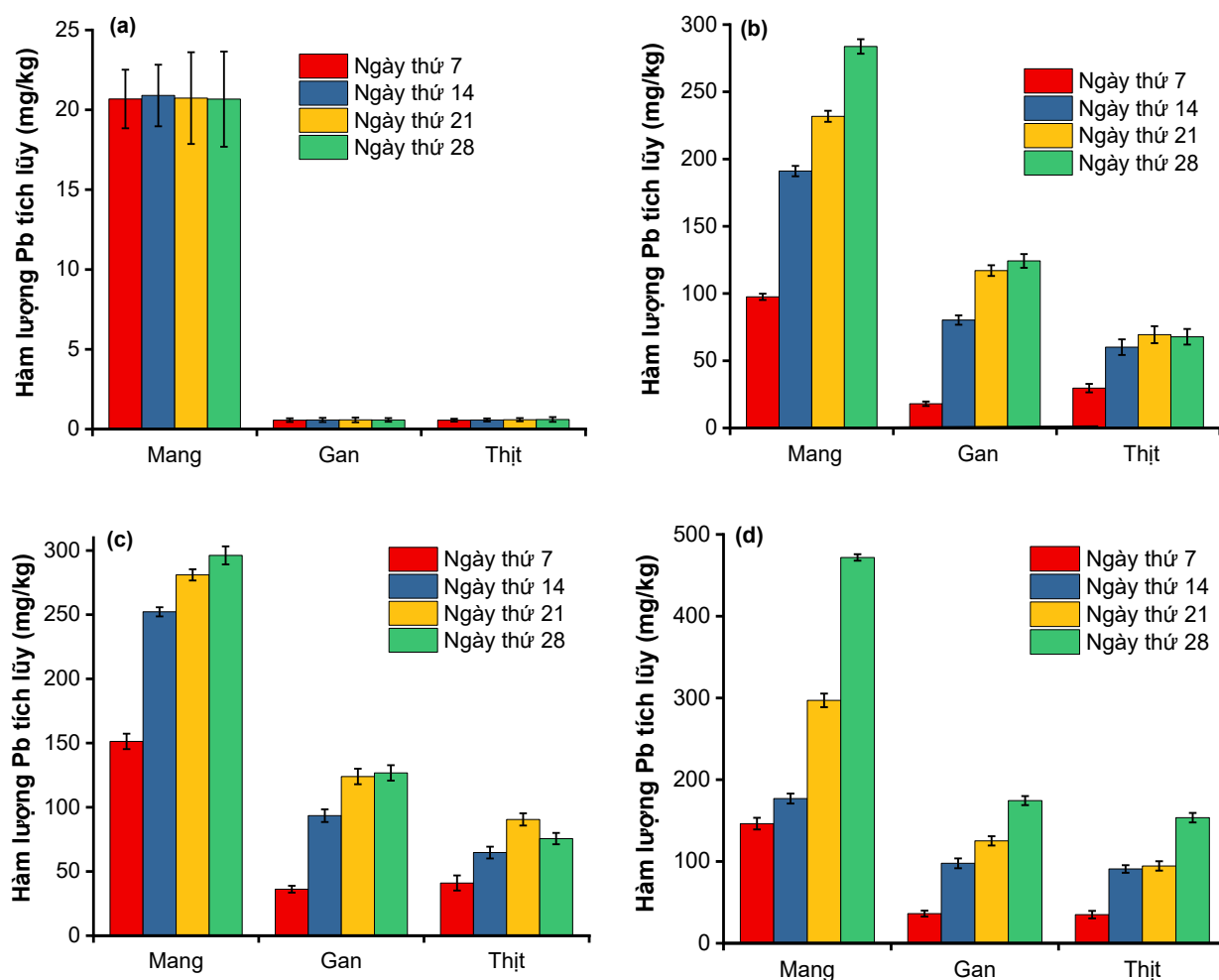
So với tỷ lệ $\frac{Pb_{mang}}{Pb_{gan}}$, tỷ lệ $\frac{Pb_{mang}}{Pb_{thịt}}$ trong cá phơi nhiễm Pb ít thay đổi trong suốt quá trình thí nghiệm (28 ngày), điều này có thể liên quan đến chức năng sinh lý của gan và thịt. Gan là cơ quan chính lưu trữ kim loại nặng và các dạng liên kết của lưu trữ nội bào (liên kết metallothioneins, ferritin,...) [79]. Do ở thịt có ít protein liên kết và quá trình enzyme hơn so với gan, vì vậy chúng không tích tụ nhiều kim loại nặng như gan.

+ So sánh sự tích tụ Pb giữa gan và thịt của nhóm cá đối chứng, kết quả cho thấy không có sự khác biệt về sự tích tụ Pb tại gan và thịt, tỷ lệ $\frac{Pb_{gan}}{Pb_{thịt}}$ của cá đối chứng là 1,0. Kết quả trong Bảng 3.3 cho thấy, ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu thí nghiệm lượng Pb tích lũy ở gan cá rô đồng phơi nhiễm Pb (nồng độ từ 20 đến 40mg/L) thấp hơn hoặc bằng lượng Pb ở thịt cá, tỷ lệ $\frac{Pb_{gan}}{Pb_{thịt}}$ đo được khoảng 0,6 đến 1,0. Từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 28, hàm lượng Pb tích tụ tại gan cá phơi nhiễm Pb 20 và 30 mg/L cao hơn lần lượt 1,3 đến 1,8 và 1,4 đến 1,7 lần so với thịt. Sau ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm Pb 40 mg/L, hàm lượng Pb tích tụ ở gan cá cao hơn 1,1 đến 1,8 lần so với thịt.

Sự tích tụ Pb tại gan cao hơn so với tại thịt sau ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm cho thấy gan tích tụ Pb ở tốc độ cao hơn thịt. Phát hiện này đã được chỉ ra trong các nghiên cứu trước đây [80]. Ngoài ra, kết quả của nghiên cứu này cũng nhấn mạnh sự vai trò của gan đối với quá trình tích tụ kim loại nặng. Một số nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng sự tích tụ kim loại ở gan cá cao hơn so với ở thịt cá [77, 81-83], điều này

có thể liên quan đến sự cảm ứng và liên kết metallothioneins, bởi vì gan là bộ phận liên tục tích tụ, chuyển hóa sinh học và giải độc [84-87]. Kim loại nặng sau khi xâm nhập vào cơ thể thì phần lớn bị giữ lại ở gan, chỉ một phần nhỏ theo máu để đến các bộ phận khác trong cơ thể [88]. Những kết quả này phù hợp với giả thuyết rằng sự tích tụ ở thịt chỉ trở nên quan trọng khi khả năng dự trữ của gan đã đạt đến mức tối đa.

Sự phân bố và tích lũy Pb tại mang, gan và thịt trong cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.11.

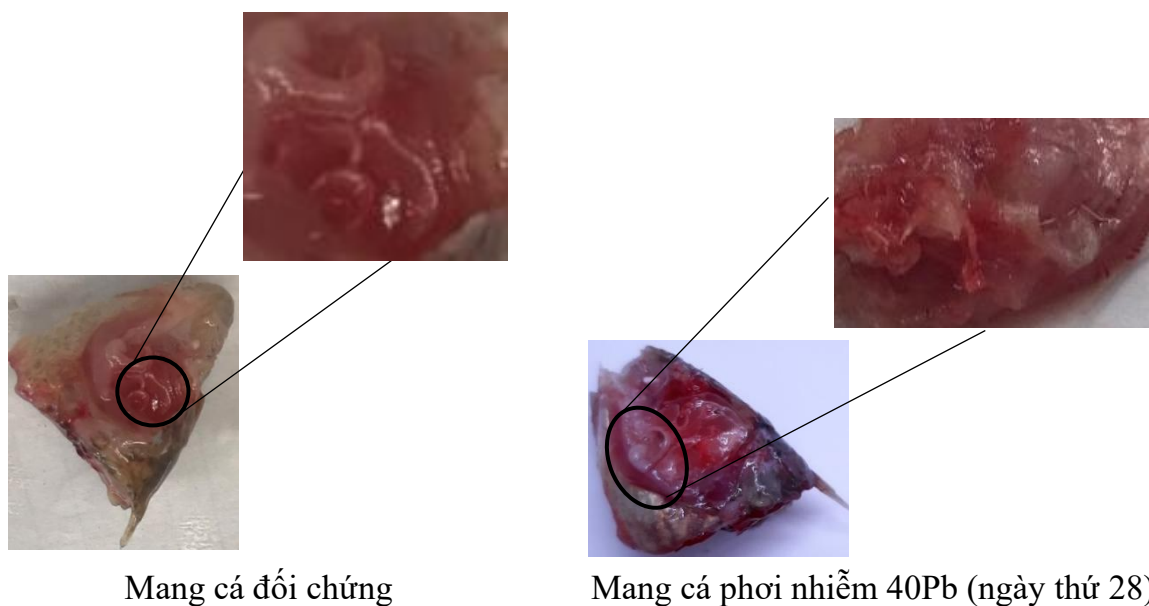


Hình 3.11. Sự phân bố và tích lũy Pb tại mang, gan và thịt cá đối chứng (a) và cá phơi nhiễm 20Pb (b), 30Pb (c) và 40Pb (d)

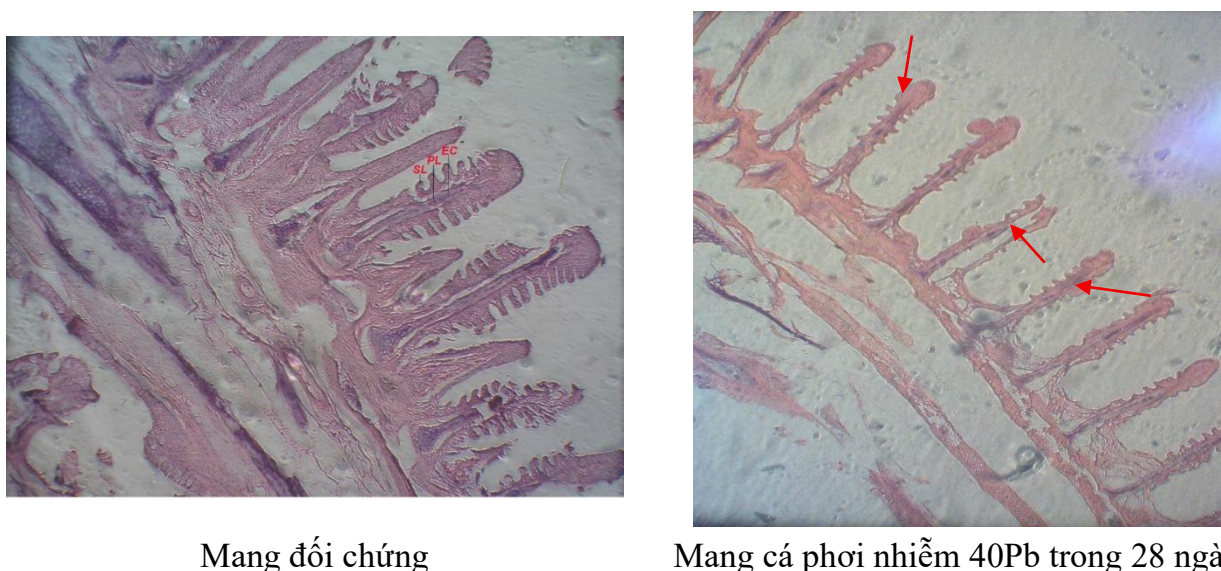
Kết quả trên Hình 3.11 cho thấy, thứ tự về sự phân bố và tích lũy Pb ở mang, gan và thịt cá theo thứ tự như sau: Mang >> Gan > Thịt. Kết quả này phù hợp với những công bố trước đây [77, 89-91], tích lũy Pb trong gan cá rô phi đỏ (*Oreochromis spp*) sống trong môi trường tự nhiên, cá rô đồng (*Anabas testudineus*), cá rô phi xanh (*Oreochromis auereus*) và cá lóc (*Channa argus*) cao hơn trong thịt. Có thể giải thích cho kết quả này là do mang là mô tiếp xúc trực tiếp với môi trường nước và bề mặt của mang cá mang điện tích âm nên chúng luôn là mục tiêu đầu tiên của các cation kim

loại nên việc tại mang cá tích lũy nhiều kim loại nặng hơn so với các bộ phận khác trong cơ thể là điều hoàn toàn hợp lý [92-94]. Bên cạnh đó mang cá là một cơ quan đa chức năng, ngoài việc cung cấp trao đổi khí dưới nước, còn đóng vai trò chủ đạo trong điều hòa thẩm thấu và ion, điều hòa acid-bazơ và bài tiết chất thải nitơ [95].

Mức độ tổn thương ở mang và gan cá cũng có thể quan sát được bằng trực quan cũng như qua ảnh chụp mô học với độ phóng đại 10x (Hình 3.12, 3.13, 3.14 và Hình 3.15).



Hình 3.12. Mang cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb



Hình 3.13. Ảnh mô học của mang cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb

Ngoài chức năng hô hấp, mang cá còn đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa thẩm thấu điều chỉnh cân bằng acid – bazơ giúp cân bằng ion và acid bazơ trong

cơ thể cá. Do diện tích bề mặt mang lớn, dễ hấp thụ và khuếch tán các ion kim loại từ nước. Việc phải sống trong môi trường ô nhiễm Pb cho thấy các phiến mang bị nát, không còn hình thái như ở nhóm cá đối chứng (Hình 3.12). Ảnh chụp mô học của mang cá đối chứng thấy rằng các hàng phiến mang thứ cấp (SL) phát triển dày, đều đặn và diện tích lớn. Bên cạnh đó xương cung mang của cá đối chứng có sự đều đặn và khá dày. Tuy nhiên với mang cá sống trong suốt quá trình phơi nhiễm Pb 28 ngày ở nồng độ 40 mg/L có thể thấy các bất thường ở các hàng phiến mang thứ cấp như các phiến mang thứ cấp bị hoại tử biểu hiện qua việc hàng phiến mang thứ cấp rất thưa, ngắn, diện tích phiến mang thứ cấp bị nhỏ lại. Bên cạnh đó có sự tăng sản tế bào nội mô (EC) biểu hiện qua sự hợp nhất giữa các phiến mang thứ cấp hình thành các cục u ở phiến mang thứ cấp. Sự tăng sản này là một cơ chế tự nhiên của cá để phòng vệ trước những xâm nhập của các chất gây ô nhiễm. Mặt khác, xương cung mang của nhóm cá phơi nhiễm bị mất đi sự đều đặn và mỏng (Hình 3.13).

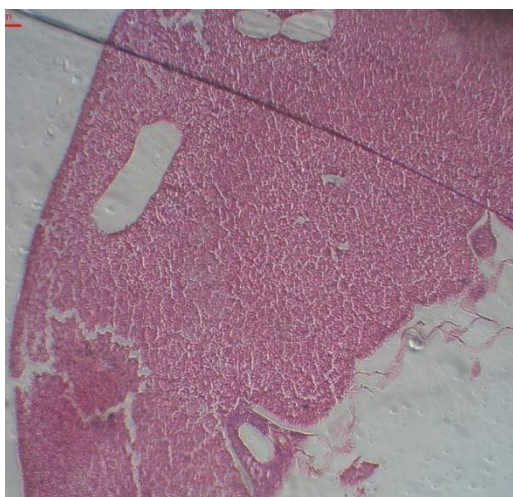


Gan cá đối chứng

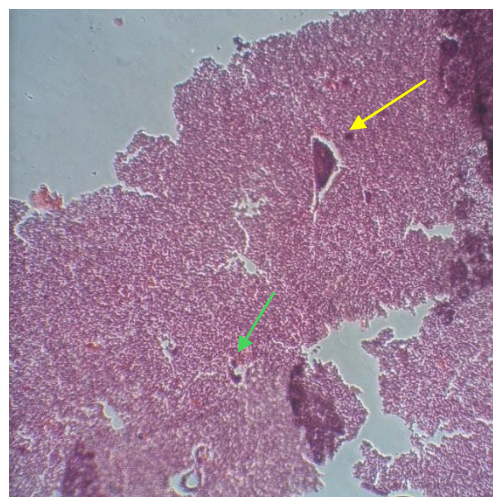


Gan cá phơi nhiễm 40Pb (ngày thứ 28)

Hình 3.14. Gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb



Gan cá đối chứng



Gan cá phơi nhiễm 40Pb (ngày thứ 28)

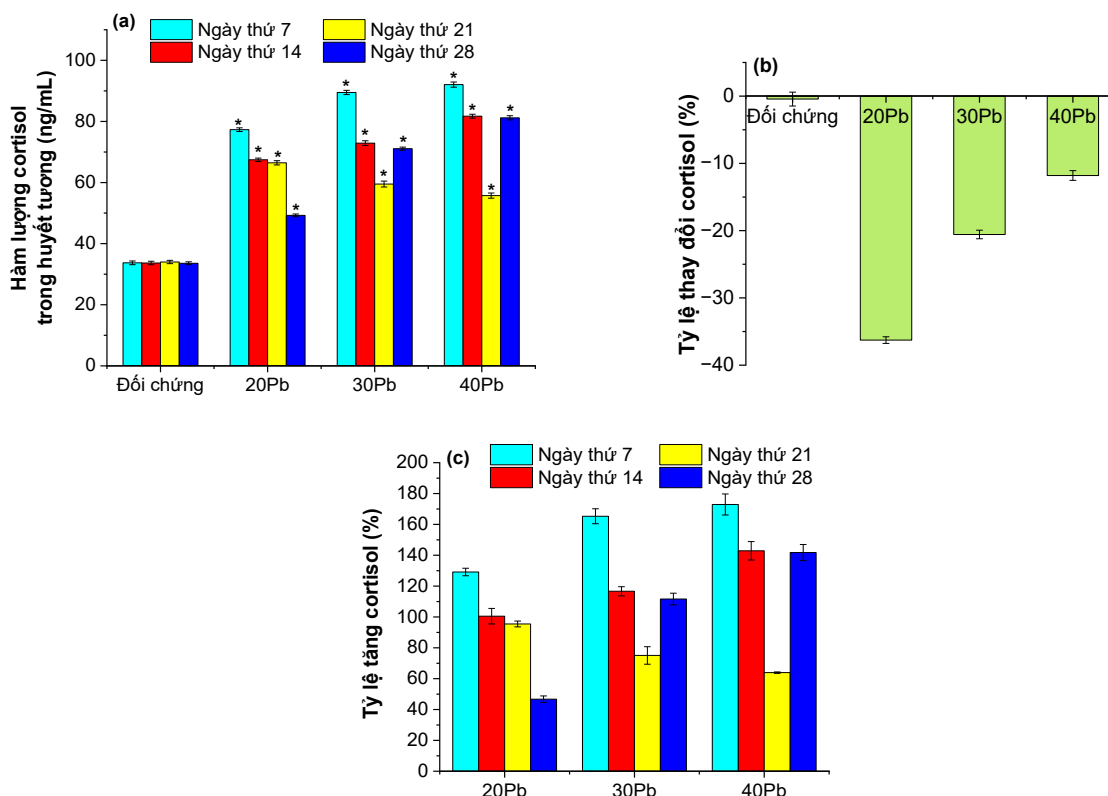
Hình 3.15. Ảnh mô học của gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm 40Pb

Do dễ bị nhiễm kim loại nặng nên gan được xem như một chỉ số về ô nhiễm nước, việc cá rô đồng sống trong môi trường nhiễm Pb trong 28 ngày đã gây tác động mạnh đến gan. Quan sát bằng trực quan có thể thấy gan nhóm cá đối chứng có màu sáng trong khi gan ở nhóm cá phơi nhiễm có nhiều vết đỏ bầm (Hình 3.14). Còn với hình ảnh mô học ở nhóm cá đối chứng có thể thấy mô gan cá đối chứng có màu hồng tươi, các tế bào gan được sắp xếp chặt chẽ và đều đặn. Còn với nhóm cá phơi nhiễm mô gan lại là màu hồng sậm, các tế bào gan mất đi sự đều đặn. Thêm vào đó có sự lắng đọng các giọt lipid màu vàng (mũi tên màu xanh) có thể là do rối loạn sinh hóa vì vậy tế bào gan không oxy hóa được acid béo làm thay đổi quá trình tổng hợp protein, điều hòa ion và cạn kiệt nguồn năng lượng. Mặt khác, có những vết màu đỏ sậm trong mô gan cá phơi nhiễm (mũi tên màu vàng) có thể là do sự rò rỉ các tế bào máu ra khỏi tĩnh mạch trung tâm (Hình 3.15). Tất cả các biểu hiện này trong mô gan cá phơi nhiễm được cho là do sự hoại tử của tế bào gan.

Việc nghiên cứu ảnh hưởng của chất ô nhiễm lên biểu mô của cá rô đồng (*Anabas testudineus*) cũng đã được nhiều báo cáo đề cập như sự ảnh hưởng của fullerene C₆₀ lên cá rô đồng thể hiện qua hoạt động của enzyme acetylcholinesterase trong não giảm đáng kể làm thay đổi những hành vi của cá. Sự tích tụ fullerene C₆₀ trong ruột cá được thể hiện qua các khối đen cho thấy sự thoái hóa nghiêm trọng của lớp mô lamina propria [96]. Năm 2023 Susri Nayak và cộng sự báo cáo sự thay đổi mô học ở mang cá như mất cấu trúc mang, hoại tử, phòng rộp biểu mô và phù nề do tác động của Naphthalene lên cá. Sự biến dạng này của mô mang đã làm giảm diện tích bề mặt hô hấp ảnh hưởng đến khả năng vận chuyển oxy và chức năng điều hòa thẩm thấu [97]. Còn với tác động lên mô gan của Naphthalene trên cá chủ yếu là hoại tử, phì đại tế bào gan, không bào hóa trong tế bào gan, tích tụ lipid xung quanh tĩnh mạch trung tâm, tổn thương tĩnh mạch trung tâm và tổn thương cấu trúc tế bào do thành tế bào bị vỡ đẩy nhân ra ngoài vi (Lipika Patnaik, 2025, [98])

c. Tác động độc tính bán trường diễn của Pb đến sự thay đổi cortisol trong huyết tương cá rô đồng

Ảnh hưởng của Pb đến lượng cortisol trong huyết tương của cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.16a và kết quả được trình bày trong Phụ lục 27.



Hình 3.16. (a) Sự thay đổi nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb; (b) Tỷ lệ giảm cortisol trong huyết tương cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Pb và (c) Tỷ lệ tăng cortisol trong huyết tương của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng

(Giá trị chính $\pm$ SD, $n = 3$);

*Sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về nồng độ cortisol trong máu cá đối chứng và cá phơi nhiễm Pb

- Kết quả phân tích thống kê cho thấy lượng cortisol trong huyết tương cá rô đồng nhiễm Pb cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với cá đối chứng. Lượng cortisol trong huyết tương cá đối chứng dao động khoảng từ $33,59 \pm 0,48$ đến $34,00 \pm 0,56$ ng/mL. Đối với cá rô đồng sống trong nước nhiễm Pb 20 mg/L, lượng cortisol trong huyết tương tăng cao tại ngày thứ 7 ($77,30 \pm 0,62$ ng/mL), hơn 2,3 lần so với cá đối chứng. Mặc dù, lượng cortisol trong huyết tương cá rô đồng từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 28 giảm so với ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm Pb 20 mg/L, nhưng vẫn cao hơn đáng kể so với lượng cortisol trong huyết tương cá đối chứng. Tại các ngày thứ 14, 21 và 28, lượng cortisol trong huyết tương cá rô đồng phơi nhiễm Pb 20 mg/L đo được lần lượt là $67,45 \pm 0,56$; $66,45 \pm 0,70$ và $49,26 \pm 0,44$ ng/mL (Hình 3.16a), cao hơn so với cá đối chứng từ 1,5 đến 2,0 lần.

+ Rối loạn cortisol đã xảy ra ở những con cá sống lâu (>14 ngày) trong nước bị ô nhiễm Pb nồng độ cao (30, 40 mg/L). Đối với cá rô đồng phơi nhiễm Pb 30 và 40 mg/L, lượng cortisol trong huyết tương tăng cao tại ngày thứ 7 và giảm dần đến ngày

thứ 21 sau đó tăng lên ở ngày thứ 28. Mặc dù, lượng cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Pb ngày thứ 21 giảm so với ngày thứ 7, tuy nhiên vẫn cao hơn đáng kể so với cá đối chứng. Ngược lại, lượng cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Pb tại ngày thứ 28 tăng lên nhưng vẫn thấp hơn so với lượng cortisol đo được tại ngày thứ 7.

+ Đối với cá phơi nhiễm Pb 30 mg/L, nồng độ cortisol trong huyết tương đo được tại ngày thứ 7 là $89,48 \pm 0,70$ ng/mL, cao hơn 2,7 lần so với cá đối chứng. Tại ngày thứ 14, 21 và 28, nồng độ cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Pb 30 mg/L đo được lần lượt là $72,90 \pm 0,78$; $59,50 \pm 0,97$ và $71,07 \pm 0,52$ ng/mL, cao hơn so với cá đối chứng từ 1,8 đến 2,7 lần. Đối với cá phơi nhiễm Pb 40 mg/L, nồng độ cortisol trong huyết tương đo được tại ngày thứ 7, 14, 21 và 28 lần lượt là $92,05 \pm 0,84$; $81,71 \pm 0,63$; $55,73 \pm 0,84$ và $81,18 \pm 0,67$ ng/mL, cao hơn từ 1,6 đến 2,7 lần so với nhóm cá đối chứng.

- Hình 3.16b trình bày tỷ lệ giảm cortisol trong huyết tương cá giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu thí nghiệm. Đối với cá đối chứng, vì không có sự khác biệt đáng kể về nồng độ cortisol giữa ngày thứ 28 và ngày thứ 7, do đó tỷ lệ cortisol trong huyết tương cá đối chứng giảm khoảng $0,44 \pm 1,03$ %. Trái ngược với cá đối chứng, nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng phơi nhiễm Pb ngày thứ 28 giảm đáng kể so với ngày thứ 7, với tỷ lệ giảm là $36,27 \pm 0,49$ % đối với nhóm 20Pb; $20,57 \pm 0,63$ % đối với nhóm 30Pb và $11,80 \pm 0,72$ % đối với nhóm 40Pb. Đáng chú ý, cá phơi nhiễm Pb nồng độ càng cao thì tỷ lệ giảm cortisol càng thấp, điều này có thể là do rối loạn sản xuất cortisol đối với nhóm cá 30Pb và 40Pb sau 14 ngày kể từ lúc phơi nhiễm.

- Hình 3.16c trình bày tỷ lệ tăng cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng. Nồng độ cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L đo được tại các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 tăng lần lượt khoảng $129,16 \pm 2,44$; $100,47 \pm 5,04$; $95,46 \pm 1,90$ và $46,68 \pm 2,11$ % so với cá đối chứng. Tỷ lệ cortisol trong huyết tương cá nhiễm Pb 30 mg/L tại ngày thứ 7 tăng $165,28 \pm 4,86$ %; ngày thứ 14 tăng $116,66 \pm 2,97$ %; ngày thứ 21 tăng $75,05 \pm 5,67$ % và ngày thứ 28 tăng $111,64 \pm 3,77$ %. Đối với nhóm cá nhiễm Pb 40 mg/L, tỷ lệ cortisol trong huyết tương cá đo được tại các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 tăng lần lượt khoảng $172,92 \pm 6,82$; $142,88 \pm 5,98$; $63,91 \pm 0,46$ và $141,75 \pm 5,24$ % so với cá đối chứng. Những phát hiện này khẳng định Pb là tác nhân hóa học gây căng thẳng đối với cá rô đồng.

Phản ứng căng thẳng là một quá trình phức tạp, dường như được kiểm soát bởi một số chất hóa học thần kinh liên quan đến trục HPI [99], là nơi kiểm soát sản xuất glucocorticoid (cortisol) và cân bằng nội môi, điều hòa nhiều chức năng sinh lý quan trọng, bao gồm quá trình trao đổi chất, chức năng miễn dịch, cân bằng ion và nước.

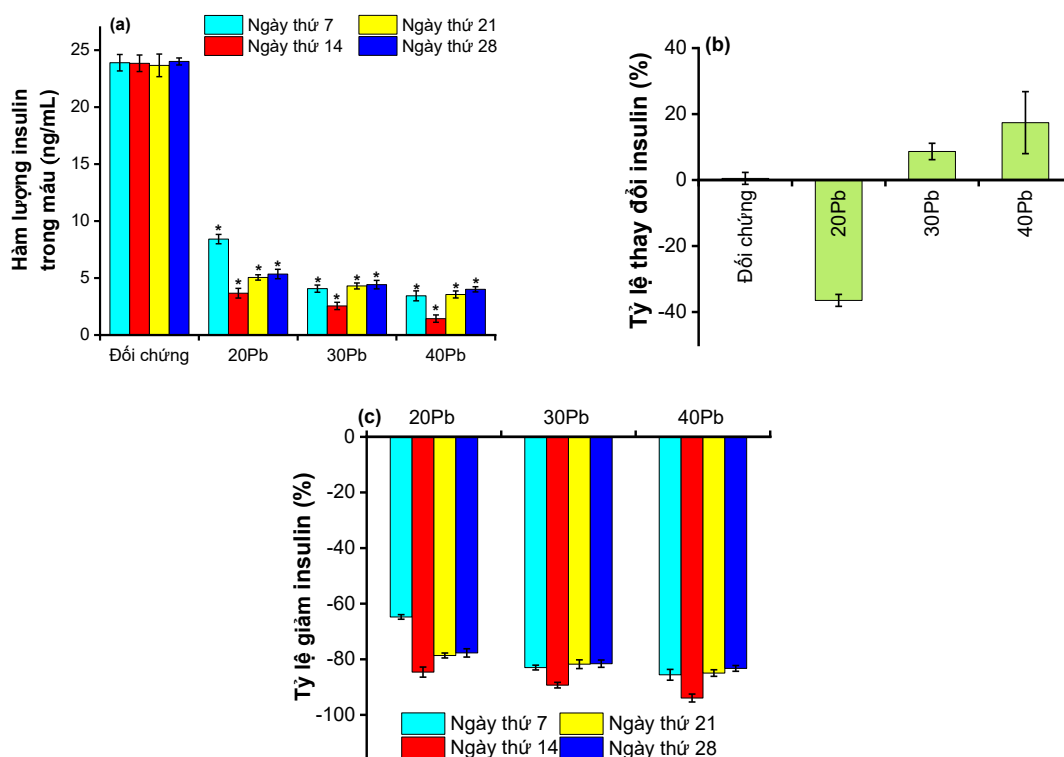
Khi sinh vật bị căng thẳng, vùng dưới đồi (hypothalamus) sẽ sản xuất ra CRH, CRH đi vào trong huyết tương sẽ tiếp tục kích thích thùy trước tuyến yên (anterior pituitary gland) sản xuất ACTH, cuối cùng ACTH kích thích tuyến liên thận giải phóng cortisol. Các nghiên cứu trước đây cho thấy kim loại nặng là tác nhân hóa học gây rối loạn chức năng hệ nội tiết của cá. Lượng cortisol trong cơ thể cá có liên quan trực tiếp đến nồng độ và mức độ độc của chất ô nhiễm. Cá sống trong nước ô nhiễm thường bị kiệt sức do rối loạn giải phóng cortisol. Chất ô nhiễm sẽ tác động lên một loạt các bộ phận như tuyến yên, vùng dưới đồi và tuyến thượng thận làm rối loạn hoạt động tuyến thượng thận dẫn đến ức chế hoặc tăng giải phóng cortisol hơn mức bình thường. Một số chất hóa học tác động lên chuỗi phản ứng chuyển hóa nên trực tiếp ảnh hưởng đến thần kinh và chức năng bên trong các mô [99-105]. Pb gây căng thẳng giảm sinh cortisol đối với cá điêu hồng (*Oreochromis SP.*) [54]. Nồng độ cortisol trong huyết tương của cá rô vàng (*Perca flavescens*) và cá chạch (*Esox lucius*) sống trong môi trường ô nhiễm (10 ng/mL) cao hơn so với cortisol của các loài cá này sống trong môi trường không bị ô nhiễm (0 – 5 ng/mL) [106]. Một nghiên cứu khác cho thấy nồng độ cortisol của cá ba gai lưng (*Gasterosteus aculeatus L.*) sống trong nước ô nhiễm nitrat, nitrit và amoniac cao hơn so với cùng loài cá sống ở nơi ít hoặc không bị ô nhiễm, nguyên nhân có thể là do chức năng trục HPI bị gián đoạn [107]. Tiếp xúc cấp tính với chất gây ô nhiễm thường gây ra căng thẳng, nhưng tiếp xúc kéo dài có thể làm suy yếu khả năng phản ứng với căng thẳng [108]. Cortisol được giải phóng trong nhiều giờ sau khi gặp phải tác nhân gây căng thẳng và khi đạt được nồng độ cortisol cần thiết, cortisol sẽ tạo ra phản hồi tiêu cực đến vùng dưới đồi, đưa trạng thái cân bằng toàn thân trở lại [109, 110]. Cá bống tròn (*Neogobius melanostomus*) là loài cá có khả năng phục hồi [108]. Tiếp xúc với tác nhân gây căng thẳng (hydrocarbon thơm đa vòng và kim loại nặng), nồng độ cortisol trong huyết tương của cá bống tròn tăng lên 100,3 ng/mL sau 10 phút; 87,5 ng/mL sau 30 phút và trở lại mức bình thường (22,3 ng/mL) sau 1,0 giờ [108]. Sự thay đổi lượng cortisol trong huyết tương cá có thể chỉ ra tình trạng sức khỏe của quần thể cá.

✚ Các kết quả về sự thay đổi cortisol trong huyết tương cá rô đồng của nghiên cứu này cho thấy, tiếp xúc lâu dài với Pb ở nồng độ cao gây ra phản ứng căng thẳng, ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động của trục HPI, dẫn đến rối loạn sản xuất cortisol.

d. Tác động độc tính bán trường diễn của Pb đến sự thay đổi insulin trong máu cá rô đồng

Ảnh hưởng của Pb đến sự thay đổi nồng độ insulin trong máu của cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.17a và kết quả được trình bày trong Phụ lục 28. Nồng độ insulin trong máu cá rô đồng phơi nhiễm Pb thấp hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với cá đối

chứng. Nồng độ insulin trong máu cá đối chứng dao động khoảng từ $23,67 \pm 0,99$ đến $24,01 \pm 0,31$ ng/mL. Đáng chú ý, nồng độ insulin trong máu cá phơi nhiễm Pb giảm xuống mức thấp nhất vào ngày thứ 14 và sau đó tăng nhẹ cho đến ngày thứ 28.



Hình 3.17. (a) Sự thay đổi nồng độ insulin trong máu cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb; (b) Tỷ lệ thay đổi insulin trong máu cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Pb và (c) Tỷ lệ giảm insulin trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng

(Giá trị chính $\pm$ SD, n = 3);

*Sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về lượng insulin trong máu cá đối chứng và cá phơi nhiễm Pb

- Kết quả trên Hình 3.17a cho thấy tác động của Pb lên hoạt động sản xuất insulin trong cá rô đồng phụ thuộc vào nồng độ. Đáng chú ý, cá phơi nhiễm Pb ở nồng độ cao thì mức insulin trong máu thấp hơn, điều này có thể liên quan đến chứng chán ăn của phơi nhiễm Pb nồng độ cao dẫn đến giảm khả năng sản xuất insulin. Nồng độ insulin đo được vào ngày thứ 7 là $8,42 \pm 0,41$ ng/mL đối với nhóm cá 20Pb; $4,07 \pm 0,32$ ng/mL đối với nhóm 30Pb và $3,44 \pm 0,43$ ng/mL đối với nhóm 40Pb, giảm 2,8 đến 6,9 lần so với cá đối chứng. Nồng độ insulin đo được vào ngày thứ 14 là $3,67 \pm 0,42$; $2,55 \pm 0,32$ và $1,44 \pm 0,32$ ng/mL tương ứng với nhóm cá phơi nhiễm Pb 20, 30 và 40 mg/L, giảm từ 6,5 đến 16,6 lần so với cá đối chứng. Nồng độ insulin trong máu cá phơi nhiễm Pb đo được tại ngày thứ 28 là $5,35 \pm 0,42$ ng/mL đối với 20Pb; $4,42 \pm 0,37$ ng/mL đối với 30Pb và $4,01 \pm 0,23$ ng/mL đối với 40Pb, cao hơn so với ngày thứ 14 từ 1,46 đến 2,78 lần.

- Tỷ lệ thay đổi insulin trong máu cá giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm được trình bày trên Hình 3.17b. Không có sự khác biệt đáng kể về lượng insulin trong máu cá đối chứng giữa ngày thứ 28 và ngày thứ 7, do đó tỷ lệ insulin trong máu cá đối chứng tăng khoảng $0,50 \pm 1,80$ %. Pb là một kim loại không thiết yếu, không có chức năng sinh học và có thể gây độc cho động vật thủy sinh khi tiếp xúc ở nồng độ cao và kéo dài thời gian tiếp xúc. Kết quả trên Hình 3.17b cho thấy, đối với cá phơi nhiễm Pb 20 mg/L, tỷ lệ insulin trong máu đo được tại ngày thứ 28 giảm $36,48 \pm 1,80$ % so với ngày thứ 7. Ngược lại, tỷ lệ insulin trong máu cá phơi nhiễm Pb 30 và 40 mg/L đo được tại ngày thứ 28 tăng so với ngày thứ 7, tăng khoảng $8,67 \pm 2,48$ đối với nhóm 30Pb và $17,39 \pm 9,40$ % đối với nhóm 40Pb.

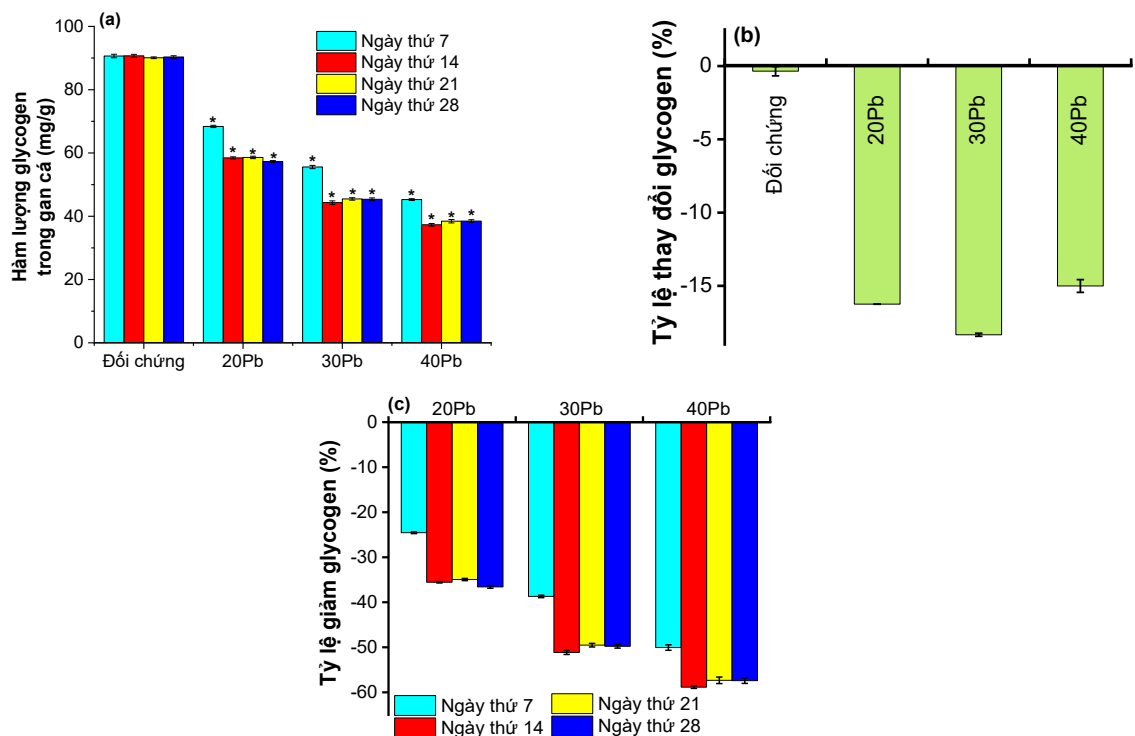
- Tỷ lệ giảm insulin trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng được trình bày trên Hình 3.17c. So với cá đối chứng, tỷ lệ insulin trong máu cá rô đồng phơi nhiễm Pb 20 mg/L giảm $64,78 \pm 0,82$ % ở ngày thứ 7; $84,61 \pm 1,82$ % ở ngày thứ 14; $78,64 \pm 0,90$ % ở ngày thứ 21 và $77,71 \pm 1,50$ % ở ngày thứ 28. Tỷ lệ insulin trong máu cá rô đồng phơi nhiễm Pb 30 mg/L tại các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 giảm so với cá đối chứng lần lượt là $82,99 \pm 0,87$; $89,31 \pm 1,00$; $81,77 \pm 1,57$ và $81,59 \pm 1,32$ %. Tỷ lệ insulin trong nhóm cá phơi nhiễm Pb 40 mg/L giảm so với cá đối chứng là $85,59 \pm 1,95$ % (ngày thứ 7); $93,95 \pm 1,42$ % (ngày thứ 14); $84,96 \pm 1,19$ % (ngày thứ 21) và $83,28 \pm 1,05$ % (ngày thứ 28).

Mặc dù, không có cá chết trong tất cả các thí nghiệm ô nhiễm Pb, tuy nhiên sự giảm đáng kể lượng insulin trong máu cá phơi nhiễm Pb, cho thấy tác hại của Pb đến hoạt động của tuyến tụy, dẫn đến rối loạn giải phóng insulin. Insulin là một dipeptide bao gồm một chuỗi A có 21 acid amin và một chuỗi B có 30 acid amin được liên kết với nhau bằng liên kết disulfide, hai chuỗi insulin tạo thành một cấu trúc có trật tự cao với các vùng xoắn ốc trong mỗi chuỗi và các chuỗi insulin riêng lẻ không hoạt động. Insulin được tổng hợp bởi các tế bào β tuyến tụy ở các đảo Langerhans [111]. Insulin chuyển hóa glucose thành năng lượng và tích trữ glucose trong cơ bắp, tế bào mỡ và gan dưới dạng glycogen. Sau khi ăn, lượng glucose trong máu sẽ tăng lên, sự gia tăng glucose này sẽ kích hoạt tuyến tụy giải phóng insulin đi vào máu đến các tế bào của cơ thể, nó ra lệnh cho các tế bào mỡ ra để cho glucose xâm nhập vào. Khi vào bên trong, các tế bào sẽ chuyển glucose thành năng lượng hoặc tích trữ dưới dạng glycogen. Nếu không có insulin, cơ thể không thể sử dụng hoặc tích trữ glucose để tạo năng lượng. Cạn kiệt insulin, phần lớn các tế bào trong cơ thể không thể hấp thụ glucose và bắt đầu chuyển sang sử dụng các nhiên liệu thay thế như acid béo để cung cấp năng lượng [111]. Cá bị căng thẳng do ô nhiễm sẽ phát ra các dấu hiệu như một phản ứng với các rối loạn trong cơ thể. Phản ứng căng thẳng của cá được đặc trưng bởi những thay đổi

về sinh lý, thay đổi quá trình trao đổi chất, phá vỡ cân bằng nội môi trong cơ thể [112]. Tác hại của Pb đến cá rô đồng trong nghiên cứu này được nhận biết qua hành vi bơi chậm chạp và chán ăn. Tín hiệu căng thẳng bởi Pb được truyền đến vùng dưới đồi thông qua hệ thần kinh, thúc đẩy tuyến thượng thận giải phóng catecholamine – nhóm hormone và chất dẫn truyền thần kinh được sản xuất trong cơ thể. Catecholamine ức chế sản xuất insulin bằng cách kích thích thụ thể α của tuyến tụy [113], điều này giải thích cho hiện tượng giảm lượng insulin trong cá phơi nhiễm Pb đến ngày thứ 14. Tuy nhiên, căng thẳng kéo dài có thể hormone catecholamine đã kích thích thụ thể β của tuyến tụy dẫn đến giải phóng insulin, điều này giải thích cho hiện tượng tăng nhẹ lượng insulin trong cá phơi nhiễm Pb từ ngày thứ 21 đến ngày thứ 28.

✚ Các kết quả về sự thay đổi insulin trong máu cá rô đồng của nghiên cứu này cho thấy, tiếp xúc lâu dài với Pb ở nồng độ cao gây ra phản ứng căng thẳng, ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động của tuyến tụy, dẫn đến rối loạn sản xuất insulin.

e. Tác động độc tính bán trường diễn của Pb đến sự thay đổi glycogen trong gan cá rô đồng



Hình 3.18. (a) Sự thay đổi hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Pb; (b) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Pb và (c) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan của cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng

(Giá trị chính $\pm$ SD, $n = 3$);

*Sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về lượng glycogen trong gan cá đối chứng và cá phơi nhiễm Pb

Ảnh hưởng của Pb đến sự thay đổi glycogen trong gan cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.18a và kết quả được trình bày trong Phụ lục 29. Hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng sống trong nước ô nhiễm Pb thấp hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với cá đối chứng. Hàm lượng glycogen trong gan của cá đối chứng được tìm thấy khoảng từ 90,09 đến 90,69 mg/g.

- Đối với nhóm cá phơi nhiễm Pb, hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng giảm khi nồng độ Pb trong nước tăng và kéo dài thời gian sống trong nước ô nhiễm. Ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, hàm lượng glycogen trong gan đo được là $68,39 \pm 0,36$ mg/g đối với nhóm phơi nhiễm 20Pb; $55,56 \pm 0,53$ mg/g đối với nhóm phơi nhiễm 30Pb và $45,27 \pm 0,29$ mg/g đối với nhóm phơi nhiễm 40Pb, thấp hơn so với cá đối chứng từ 1,33 đến 2,00 lần. Sau ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm Pb, hàm lượng glycogen trong gan cá ít thay đổi từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 28 kể từ lúc phơi nhiễm Pb, hàm lượng glycogen trong gan cá đo được từ $57,28 \pm 0,30$ đến $58,60 \pm 0,39$ mg/g đối với nhóm phơi nhiễm 20Pb; từ $44,30 \pm 0,56$ đến $45,47 \pm 0,39$ mg/g đối với nhóm phơi nhiễm 30Pb và từ $37,32 \pm 0,42$ đến $38,48 \pm 0,44$ mg/g đối với nhóm phơi nhiễm 40Pb. Sự giảm đáng kể glycogen dự trữ trong gan của cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) tiếp xúc với Pb (17,5 và 35,0 mg/L) mức dưới ngưỡng gây chết cũng đã được báo cáo [114]. Sự giảm hàm lượng glycogen trong gan cũng đã được phát hiện đối với cá đầu rắn đốm (*Channa perfatus*) sống trong nước thải [115]. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy, hàm lượng glycogen dự trữ liên tục giảm đối với cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) sống trong nước ô nhiễm CdCl_2 dưới mức gây chết [116, 117]. Sự giảm hàm lượng glycogen đối với cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) và cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) phơi nhiễm Pb và As cũng được báo cáo [118, 119]. Ngoài ra, hàm lượng glycogen trong gan cá da trơn (*Heteropneustes Fossilis*) giảm đáng kể trong 20 ngày đầu phơi nhiễm As và Pb [44].

- Hình 3.18b trình bày tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm. Không có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng glycogen trong gan cá đối chứng giữa ngày thứ 28 và ngày thứ 7, do đó tỷ lệ glycogen trong gan cá đối chứng giảm khoảng $0,35 \pm 0,32$ %. So với ngày thứ 7, tỷ lệ glycogen trong gan cá phơi nhiễm Pb ngày thứ 28 giảm là $16,24 \pm 0,01$ % đối với nhóm phơi nhiễm 20Pb; $18,33 \pm 0,10$ % đối với nhóm phơi nhiễm 30Pb và $17,66 \pm 0,43$ % đối với nhóm phơi nhiễm 40Pb.

- Tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá rô đồng phơi nhiễm Pb so với cá đối chứng được trình bày trên Hình 3.18c. so với cá đối chứng, tỷ lệ glycogen trong gan cá của nhóm phơi nhiễm 20Pb đã giảm $24,55 \pm 0,21$ % ở ngày thứ 7; $35,55 \pm 0,16$ % ở ngày 14; $34,95 \pm 0,25$ % ở ngày 21 và $36,58 \pm 0,30$ % ở ngày thứ 28. Tỷ lệ glycogen trong

gan cá của nhóm phơi nhiễm 30Pb giảm so với cá đối chứng là $38,70 \pm 0,27$ % (ngày thứ 7); $51,15 \pm 0,43$ % (ngày thứ 14); $49,52 \pm 0,40$ % (ngày thứ 21) và $49,77 \pm 0,41$ % (ngày thứ 28). Từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 28 kể từ lúc phơi nhiễm Pb, tỷ lệ glycogen trong gan cá nhóm phơi nhiễm 40Pb giảm so với cá đối chứng từ $50,05 \pm 0,61$ đến $58,85 \pm 0,28$ %.

Là một đại phân tử polysaccharide đa nhánh của glucose, glycogen là nguồn năng lượng dự trữ chính cho cá và các loài động vật khác. Bởi vì glycogen là một chỉ số quan trọng cho hoạt động sống của cơ thể nên hàm lượng glycogen trong các bộ phận khác nhau của cơ thể cá đã được nghiên cứu trong một thời gian dài [120]. Đối với cá, glycogen được dự trữ nhiều nhất trong gan, cơ đỏ và một phần ở não cá. Hàm lượng glycogen trong các bộ phận của cơ thể có thể thay đổi bởi vì nó được sử dụng khi cần thiết và được dự trữ trở lại khi hấp thụ thêm glucose từ thức ăn. Glycogen ở gan là nguồn năng lượng dự trữ luôn có sẵn và phản ứng chuyển hóa đầu tiên đối với cá trong thời gian đói là sử dụng glycogen gan. Hàm lượng glycogen trong gan của cá trắm đen (*Mylopharyngodon piceus*) được phát hiện giảm đáng kể khi bị đói [121]. Tiếp xúc với Pb có thể kích thích các hormone (như glucagon,..), tăng cường hoạt động của enzyme huy động glycogen (chủ yếu là glycogen phosphorylase) gây ra sự phân giải glycogen [114].

Trong nghiên cứu này, hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng phơi nhiễm Pb giảm đáng kể so với cá đối chứng. Sự giảm hàm lượng glycogen trong gan của cá rô đồng cho thấy sự gia tăng huy động glucose từ dạng dự trữ (glycogen) để đáp ứng nhu cầu năng lượng cao do căng thẳng Pb. Ngoài ra, tác động tiêu cực của Pb đối với cá rô đồng được nhìn thấy rõ qua việc giảm đáng kể lượng thức ăn tiêu thụ. Sự giảm đáng kể lượng thức ăn tiêu thụ đối với cá bị nhiễm độc Pb có thể là do sự rối loạn chức năng gan, dẫn đến giảm hoạt động của các enzyme tiêu hóa chính (proteinase và glycosidase) trong ruột. Sự giảm hoạt động của các enzyme tiêu hóa ảnh hưởng đến hiệu quả đồng hóa thức ăn ở cá [44, 122, 123] dẫn đến đói kéo dài, điều này thúc đẩy phân giải glycogen dự trữ trong gan để cung cấp glucose cho máu. Giai đoạn đầu của thời gian đói, phân giải glycogen từ gan đóng vai trò quan trọng bởi vì quá trình này giải phóng glucose và điều chỉnh cân bằng glucose trong máu [124]. Ngoài quá trình phân giải glycogen, sự cân bằng giữa quá trình đường phân và quá trình tân tạo glucose cũng rất quan trọng để duy trì cân bằng glucose trong thời gian đói [121]. Đường phân là quá trình chuyển đổi glucose thành pyruvate và tạo ra một lượng nhỏ ATP (năng lượng) và NADH (năng lượng khử). Nó tạo ra các tiền chất chuyển hóa quan trọng bao gồm glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate, glyceric acid-3-phosphate, phosphoenolpyruvate và pyruvate. Tân tạo glucose là quá trình tổng

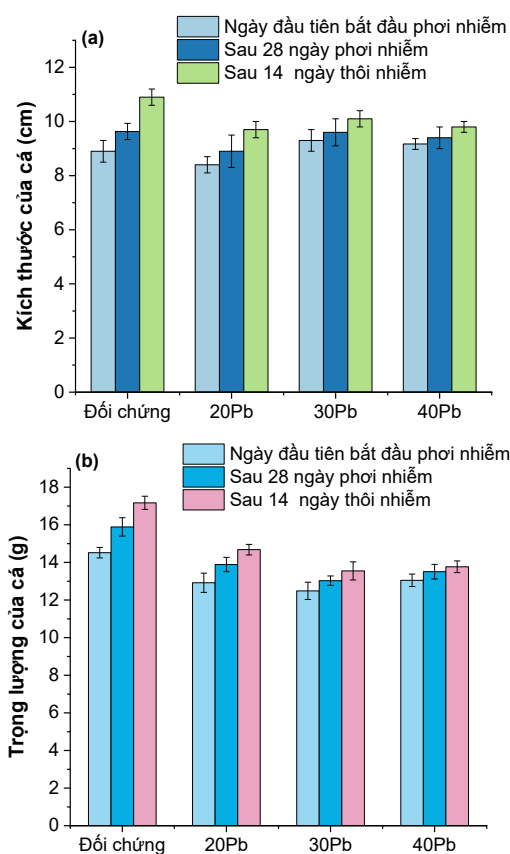
hợp glucose từ các tiền chất không phải carbohydrate (như lipid và protein) và về cơ bản là quá trình đảo ngược quá trình đường phân.

✚ Các kết quả về sự giảm glycogen trong gan cá rô đồng của nghiên cứu này cho thấy, tiếp xúc lâu dài với Pb ở nồng độ cao gây ra phản ứng căng thẳng, suy yếu chức năng gan, giảm hoạt động của enzyme tiêu hóa và ảnh hưởng đến hiệu quả đồng hóa thức ăn, dẫn đến phân giải glycogen dự trữ ở gan.

3.2.2.2. Cá rô đồng thôi nhiễm Pb

a. Sự thay đổi về trọng lượng và kích thước của cá rô đồng trong quá trình thôi nhiễm (14 ngày)

Sau 14 ngày thôi sống trong nước ô nhiễm Pb, sự thay đổi về kích thước và trọng lượng của cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.19 và trong Phụ lục 30.



Hình 3.19. Sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng tại các thời điểm bắt đầu phơi nhiễm Pb, ngày thứ 28 phơi nhiễm và ngày thứ 14 thôi nhiễm

Sau 42 ngày thí nghiệm bao gồm 28 ngày của giai đoạn phơi nhiễm và 14 ngày của giai đoạn thôi nhiễm, cá đối chứng rất khỏe mạnh, bơi nhanh, ăn tốt và phát triển bình thường. So với ngày bắt đầu phơi nhiễm (ngày bắt đầu thí nghiệm), kích thước của cá đối chứng tăng 22,50 % và trọng lượng cá đối chứng tăng 18,25 %. Trong giai đoạn phơi nhiễm (28 ngày), kích thước của cá đối chứng tăng 8,20 % và trọng lượng cá đối chứng tăng 9,44 %. Trong giai đoạn thôi nhiễm (14 ngày), kích thước của cá đối

chúng tăng 13,20 % và trọng lượng cá đối chứng tăng 8,06 %. Kết quả này cho thấy điều kiện nuôi là hợp lý và không làm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cá rô đồng.

Tác động tiêu cực của Pb đối với cá rô đồng được thể hiện rõ ràng qua tình trạng phục hồi chậm. Cá rô đồng đã từng phơi nhiễm Pb nồng độ càng cao thì tăng trưởng về kích thước và trọng lượng càng chậm, kể cả khi được sống trong nước sạch. Mặc dù, Pb có ảnh hưởng nhất định đến sức khỏe và khả năng phục hồi của cá rô đồng phơi nhiễm Pb, tuy nhiên sau 3 ngày được sống trong nước sạch thì phản ứng của cá trở nên linh hoạt hơn và ăn nhiều thực phẩm hơn, kết quả là kích thước và trọng lượng của cá đã từng phơi nhiễm Pb tăng (Hình 3.19 và Phụ lục 30).

+ Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 20 mg/L, kích thước và trọng lượng của cá tại ngày thứ 14 giai đoạn thôi nhiễm (ngày kết thúc thí nghiệm) tăng lần lượt là 15,10 và 13,62 % so với kích thước và trọng lượng của cá tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Giai đoạn phơi nhiễm (28 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 6,00 % và 7,56 %. Giai đoạn thôi nhiễm (14 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 8,70 % và 5,69 %.

+ Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 30 mg/L, kích thước và trọng lượng của cá trong suốt quá trình thí nghiệm (42 ngày) tăng lần lượt là 8,90 và 8,49 %. Trong đó, giai đoạn phơi nhiễm (28 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 3,20 % và 4,32 %. Giai đoạn thôi nhiễm (14 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 5,50 % và 3,99 %.

+ Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 40 mg/L, kích thước và trọng lượng của cá trong 42 ngày thí nghiệm tăng lần lượt là 6,50 và 5,52 %. Trong đó, giai đoạn 28 ngày phơi nhiễm, kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 2,50 % và 3,52 %. Giai đoạn 14 ngày thôi nhiễm, kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 3,90 % và 1,92 %.

b. Sự đào thải Pb ở mang, gan và thịt của cá rô đồng sau 14 ngày thôi nhiễm

Giống như sự tích tụ, nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình đào thải kim loại ra khỏi các mô bao gồm thời gian, nhiệt độ, hoạt động trao đổi chất của động vật và cũng như các mô liên quan. Các con đường đào thải kim loại ra khỏi cá thường là mật, nước tiểu, mang và chất nhầy. Bên cạnh đó, quá trình đào thải kim loại nặng của cá còn phụ thuộc vào thời gian bán hủy sinh học của kim loại. Thời gian bán hủy sinh học của kim loại tại mang ngắn và thời gian bán hủy sinh học của kim loại tại gan dài [125, 126].

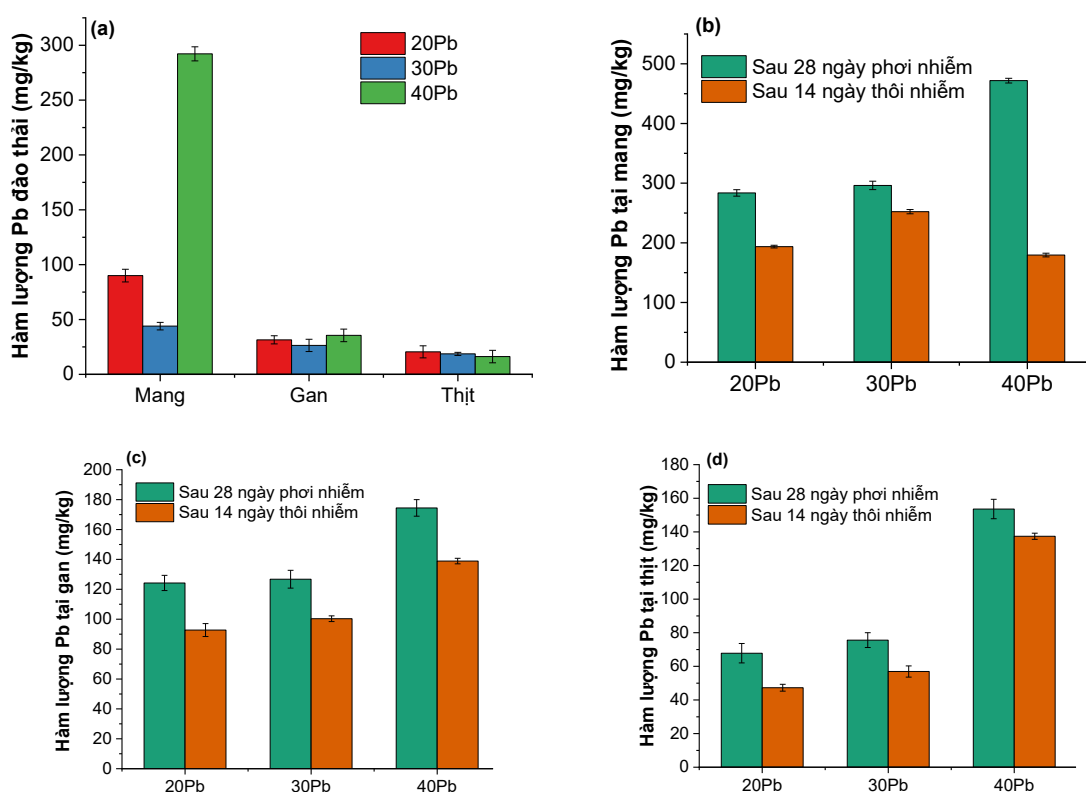
Sự thay đổi hàm lượng Pb trong mang, gan và thịt cá đã từng phơi nhiễm Pb sau 14 ngày sống trong nước sạch so với hàm lượng Pb tích lũy trong cá khi mới bắt đầu sống trong nước sạch được trình bày trên Hình 3.20 và kết quả thực nghiệm trong Phụ

lục 31. Hàm lượng Pb được đào thải ở cá phơi nhiễm sau 14 ngày sống trong nước sạch được trình bày trong Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Hàm lượng Pb đào thải ở các mô của cá rô đồng sau 14 ngày phơi nhiễm

Mô cá	Hàm lượng Pb đào thải (mg/kg)		
	20Pb	30Pb	40Pb
Mang	89,99 ± 5,77	43,98 ± 3,45	292,19 ± 6,40
Gan	31,48 ± 3,68	26,42 ± 5,59	35,53 ± 5,70
Thịt	20,53 ± 5,50	18,66 ± 1,40	16,19 ± 5,68

Quá trình đào thải Pb tích tụ ra khỏi mang, gan và thịt cá sau 28 ngày phơi nhiễm Pb chủ yếu phụ thuộc vào chức năng của từng loại mô. Vì đối với quá trình đào thải, việc vận chuyển máu rất quan trọng để bài tiết qua thận và mang. Gan của các loài cá được chỉ ra là nơi giải độc chính đối với kim loại. Sau các quá trình hòa tan và liên hợp thành công trong gan, kim loại được bài tiết vào mật hoặc đưa trở lại máu để có thể bài tiết qua thận hoặc mang. Tuy nhiên, một số kim loại khó bị loại bỏ, điều này có thể dẫn đến tích tụ trong các mô của cá [79, 127]. Kết quả trên Hình 3.20 cho thấy hàm lượng Pb trong mang, gan và thịt cá đã từng phơi nhiễm giảm sau 14 ngày sống trong nước sạch.



Hình 3.20. Hàm lượng Pb ở mang, gan và thịt của cá rô đồng (a) Lượng Pb được đào thải, (b) Lượng Pb tại mang, (c) Lượng Pb tại gan và (d) Lượng Pb tại thịt ở ngày thứ 28 của giai đoạn phơi nhiễm và ngày thứ 14 của giai đoạn thôi nhiễm

Đào thải Pb từ mang: Sự đào thải bất thường đã được tìm thấy trên mang của các nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb. Sự đào thải Pb tại mang của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 20 mg/L là $89,99 \pm 5,77$ mg/kg. Sự đào thải Pb tại mang của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 30 mg/L là $43,98 \pm 3,45$ mg/kg. Đáng chú ý, sự đào thải đáng kể Pb trên mang của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 40 mg/L, hàm lượng Pb được đào thải ở nhóm này là $292,19 \pm 6,40$ mg/kg.

Đào thải Pb từ gan: Sự đào thải Pb ở gan của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 20 mg/L là khoảng $31,48 \pm 3,68$ mg/kg. Đối với các nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 30 và 40 mg/L, lượng đào thải Pb lần lượt là $26,42 \pm 5,59$ và $35,53 \pm 5,70$ mg/kg.

Đào thải Pb từ thịt: Sự đào thải Pb ở thịt của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 20 mg/L là cao nhất, tiếp theo là nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 30 mg/L và cuối cùng là nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 40 mg/L. Lượng Pb được đào thải ở thịt của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 20 mg/L là $20,53 \pm 5,50$ mg/kg. Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 30 và 40 mg/L, hàm lượng này lần lượt là $18,66 \pm 1,40$ và $16,19 \pm 5,68$ mg/kg. Có thể thấy quy luật đào thải Pb ở cá rô đồng của nghiên cứu này là Mang > Gan > Thịt.

Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy mang là nơi đào thải kim loại nhanh nhất [125, 126], điều này có thể là do mang tiếp xúc trực tiếp với môi trường nước và kim loại tích tụ trong mang có thể được hấp phụ trên bề mặt mang và nằm trong hệ thống tuần hoàn. Trong nghiên cứu hiện tại, hàm lượng Pb tại mang cá đã từng phơi nhiễm Pb 40 mg/L đào thải rất nhiều ($292,19 \pm 6,40$ mg/kg), điều này có thể là do quá nhiều Pb hấp thu trên bề mặt của mang. Còn đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Pb 20 và 30 mg/L, mặc dù hàm lượng Pb đào thải ra khỏi mang không chênh lệch nhiều như ở nhóm phơi nhiễm nồng độ cao nhưng điều này cũng cho thấy được mang là bộ phận bài tiết chính ở cá rô đồng.

Pb là kim loại không thiết yếu và rất độc hại, sự tích tụ sinh học và khuếch đại của Pb dọc theo chuỗi và lưới thức ăn trong các hệ sinh thái gây ra rủi ro sức khỏe cho con người. Độ độc cấp tính của Pb đối với cá rô đồng là 120 mg/L. Pb ảnh hưởng lâu dài đến sự tăng trọng lượng và kích thước của cá rô đồng mặc dù cá phơi nhiễm Pb được sống trong nước sạch. Tích lũy Pb trong cá rô đồng tăng theo nồng độ Pb trong nước và thời gian phơi nhiễm Pb. Quy luật phân bố và tích lũy Pb trong cá rô đồng như sau: Mang >> Gan > Thịt. Căng thẳng độc hại của Pb là gây rối loạn nội tiết, suy giảm chức năng tuyến tụy và suy giảm chức năng gan của cá rô đồng dẫn đến tăng sinh cortisol, giảm sinh insulin và phân giải glycogen dự trữ. Mặc dù, mức độ loại bỏ Pb ra khỏi mang, gan và thịt cá rô đồng đã từng phơi nhiễm Pb tương đối đáng kể, tuy nhiên

khi kim loại độc hại này tích tụ trong các mô của cá thì rất khó để loại bỏ hoàn toàn ra khỏi cơ thể. Thứ tự đào thải Pb đối với cá rô đồng là Mang > Gan > Thịt.

3.3. NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CADIMI (Cd) ĐẾN CÁ RÔ ĐỒNG (*Anabas testudineus*)

3.3.1. Nghiên cứu ngưỡng độc cấp tính của Cd

3.3.1.1. Nồng độ Cd gây chết cá thí nghiệm trong 96 giờ (LC_{50} trong 96 giờ)

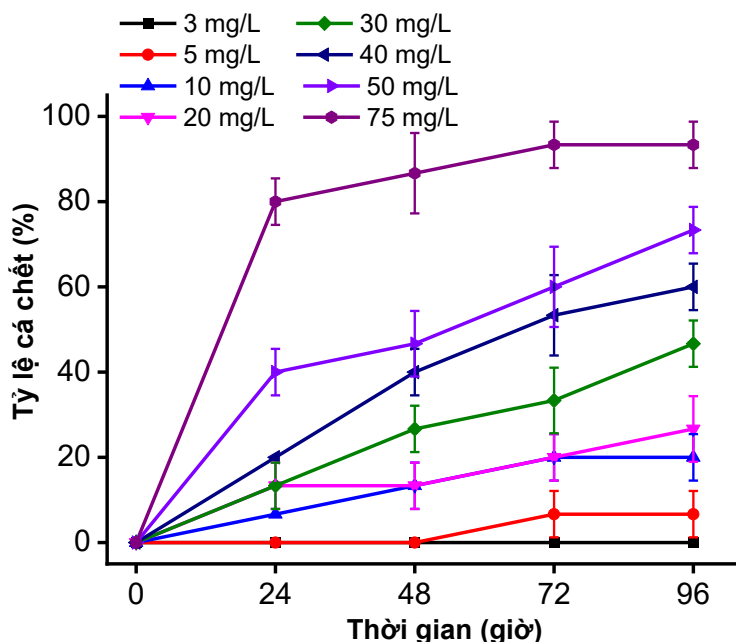
Độc cấp tính của Cd đối với cá rô đồng được đánh giá thông qua số lượng cá chết trong 96 giờ và kết quả được trình bày trên Hình 3.21 và xem số liệu trong Phụ lục 32. Kết quả trên Hình 3.21 cho thấy:

+ Không xảy ra hiện tượng cá chết ở các bể cá đối chứng và cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L trong 96 giờ.

+ Đối với bể thí nghiệm ô nhiễm Cd 5 mg/L, không có cá chết trong 48 giờ đầu của thí nghiệm, kéo dài thời gian tiếp xúc đến 96 giờ, lượng cá chết khoảng $6,67 \pm 5,44$ %.

+ Nồng độ Cd trong nước tăng từ 10 đến 50 mg/L, lượng cá chết trong 24 giờ đầu tiên tăng khoảng từ $6,67 \pm 0,00$ đến $40,00 \pm 5,44$ %. Kéo dài thời gian tiếp xúc đến 96 giờ, lượng cá chết khoảng từ $20,00 \pm 5,44$ đến $73,33 \pm 5,44$ %.

+ Đối với bể thí nghiệm ô nhiễm Cd 75 mg/L, khoảng $80,00 \pm 5,44$ % cá chết trong 24 giờ đầu tiên và lượng cá chết tăng lên $93,33 \pm 5,44$ % trong 96 giờ.

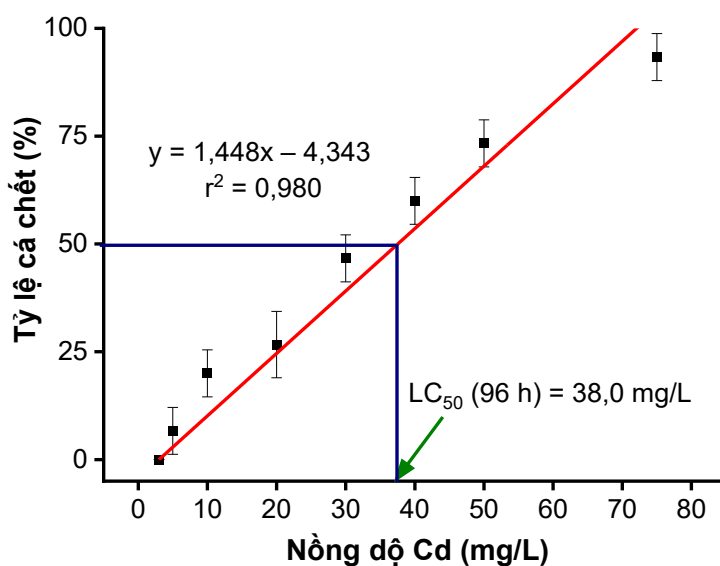


Hình 3.21. Tỷ lệ chết của cá rô đồng sau 96 giờ tiếp xúc với Cd

3.3.1.2. Ước ngưỡng độc cấp tính LC_{50} trong 96 giờ

Đồ thị tương quan giữa phần trăm cá thí nghiệm chết và nồng độ Cd trong nước được thể hiện trên Hình 3.22.

Phương trình tuyến tính tương quan giữa nồng độ Cd trong nước và phần trăm cá thí nghiệm chết là $y = 1,448x - 4,343$ với hệ số tương quan $r^2 = 0,980$. Ngưỡng độc cấp tính của Cd (LC_{50} trong 96 giờ) đối với cá rô đồng của nghiên cứu này là 38,00 mg/L. Độc tính của Cd đối với từng loài cá cũng khác nhau, ngưỡng độc cấp tính của Cd đối với cá da trơn (*Arius*) là 56,40 mg/L [128], cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) là 24,00 mg/L [129], cá sặc lùn (*Trichogaster fasciata*) là 49,50 mg/L [130], cá chép (*Cyprinus carpio*) là 74,65 mg/L [131], cá điêu hồng (*Oreochromis SP*) là 19,63 mg/L [74].



Hình 3.22. Ngưỡng độc cấp tính LC_{50} (96 giờ) đối với cá rô đồng

3.3.2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Cd đối với cá rô đồng

Để nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Cd, cá rô đồng được nuôi trong nước ô nhiễm Cd có nồng độ khoảng $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{8}$ và $\frac{1}{4}$ của giá trị LC_{50} trong 96 giờ, tương ứng với các nồng độ Cd 3mg/L, 5mg/L và 10mg/L và ký hiệu lần lượt là 3Cd, 5Cd và 10Cd.

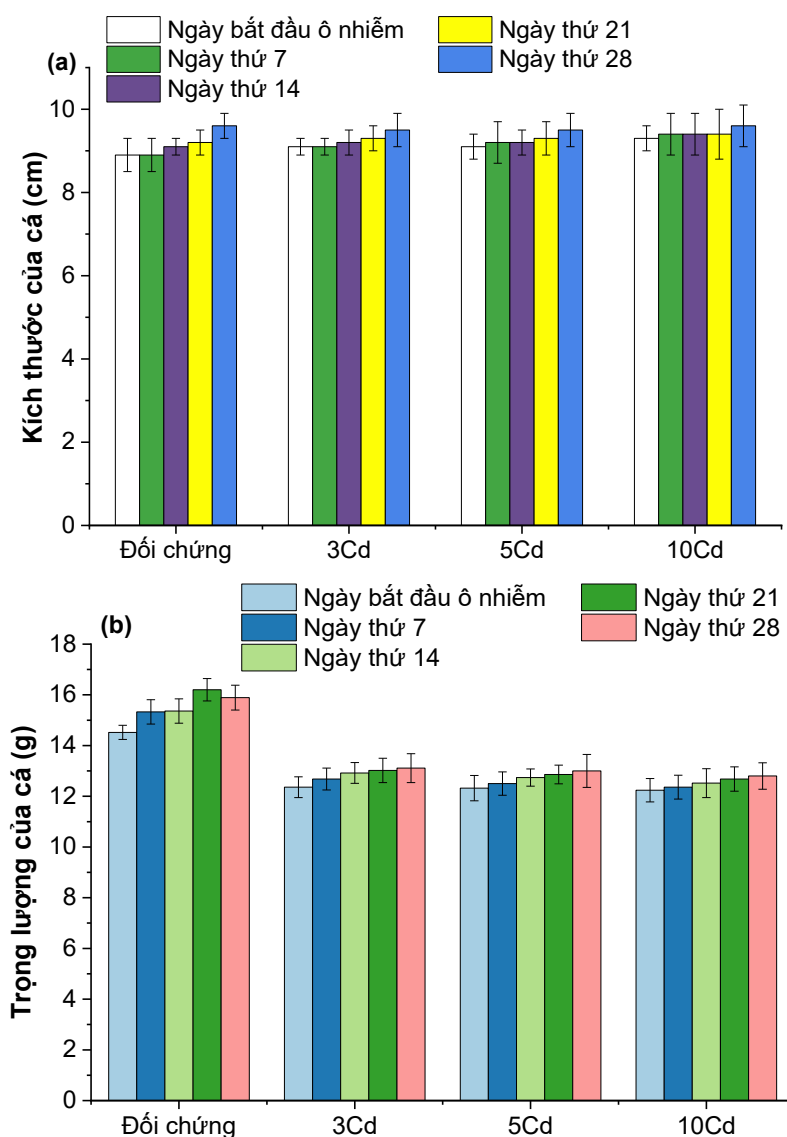
Giai đoạn phơi nhiễm: cá nuôi trong nước ô nhiễm Cd là 28 ngày, theo dõi sự thay đổi kích thước và trọng lượng cá, sự tích lũy Cd trong mang, gan, thịt cá và sự thay đổi các chỉ số sinh hóa (cortisol, insulin và glycogen).

Giai đoạn thôi nhiễm: cá ô nhiễm được nuôi trong nước sạch 14 ngày, theo dõi sự thay đổi kích thước và trọng lượng cá, sự thay đổi lượng Cd trong mang, gan, thịt cá rô đồng.

3.3.2.1. Cá rô đồng phơi nhiễm Cd

a. Tác động độc tính bán trường diễn của Cd đến sự tăng trưởng và phát triển của cá rô đồng

Sự thay đổi kích thước và trọng lượng của cá rô đồng đối chứng và cá sống trong nước ô nhiễm Cd được trình bày trên Hình 3.23 và trong Phụ lục 33.



Hình 3.23. Ảnh hưởng của Cd đến sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng

- Trong quá trình phơi nhiễm (28 ngày), cá đối chứng phản ứng nhanh, linh hoạt và ăn tốt, kích thước của cá tăng 8,2 % (kích thước đo được tại ngày bắt đầu gây ô nhiễm là $8,9 \pm 0,4$ cm và ngày thứ 28 là $9,6 \pm 0,3$ cm).

- Cá phơi nhiễm Cd, ban đầu biểu hiện nhiều triệu chứng bất thường như chuyển động giật cục, kích động, nhảy ra khỏi môi trường thử nghiệm, bơi ngang và mất thăng bằng. Sau 3 ngày phơi nhiễm, xuất hiện tình trạng lơ lờ và giảm ăn đáng kể. Cá phơi nhiễm Cd nồng độ cao hơn có vẻ chậm chạp hơn và ăn ít hơn. Tác động tiêu cực của Cd đến sự tăng kích thước của cá rô đồng tương đối rõ. So với ban đầu, kích thước cá phơi nhiễm Cd sau 28 ngày, tăng 5,3 % đối với bể 3Cd; 3,6 % đối với bể 5Cd và 3,0 % đối với bể 10Cd (Hình 3.23a). Kích thước cá phơi nhiễm Cd tăng ít hơn so cá đối chứng, điều này có thể là do cá mệt mỏi, biếng ăn dẫn đến phát triển kém.

- Trọng lượng của cá đối chứng tăng 9,44 % trong sau 28 ngày (trọng lượng ban đầu của cá đối chứng là $14,52 \pm 0,28$ g và ngày thứ 28 là $15,89 \pm 0,49$ g) (Hình 3.23b). Tương tự như kích thước, trọng lượng của cá phơi nhiễm Cd sau 28 ngày tăng tương đối ít. So với ban đầu, trọng lượng cá tại ngày thứ 28 tăng 6,07 % đối với bể 3Cd; 5,49 % đối với bể 5Cd và 4,58 % đối với bể 10Cd.

b. Tác động độc tính bán trường diễn của Cd đến quy luật tích lũy Cd trong cá rô đồng

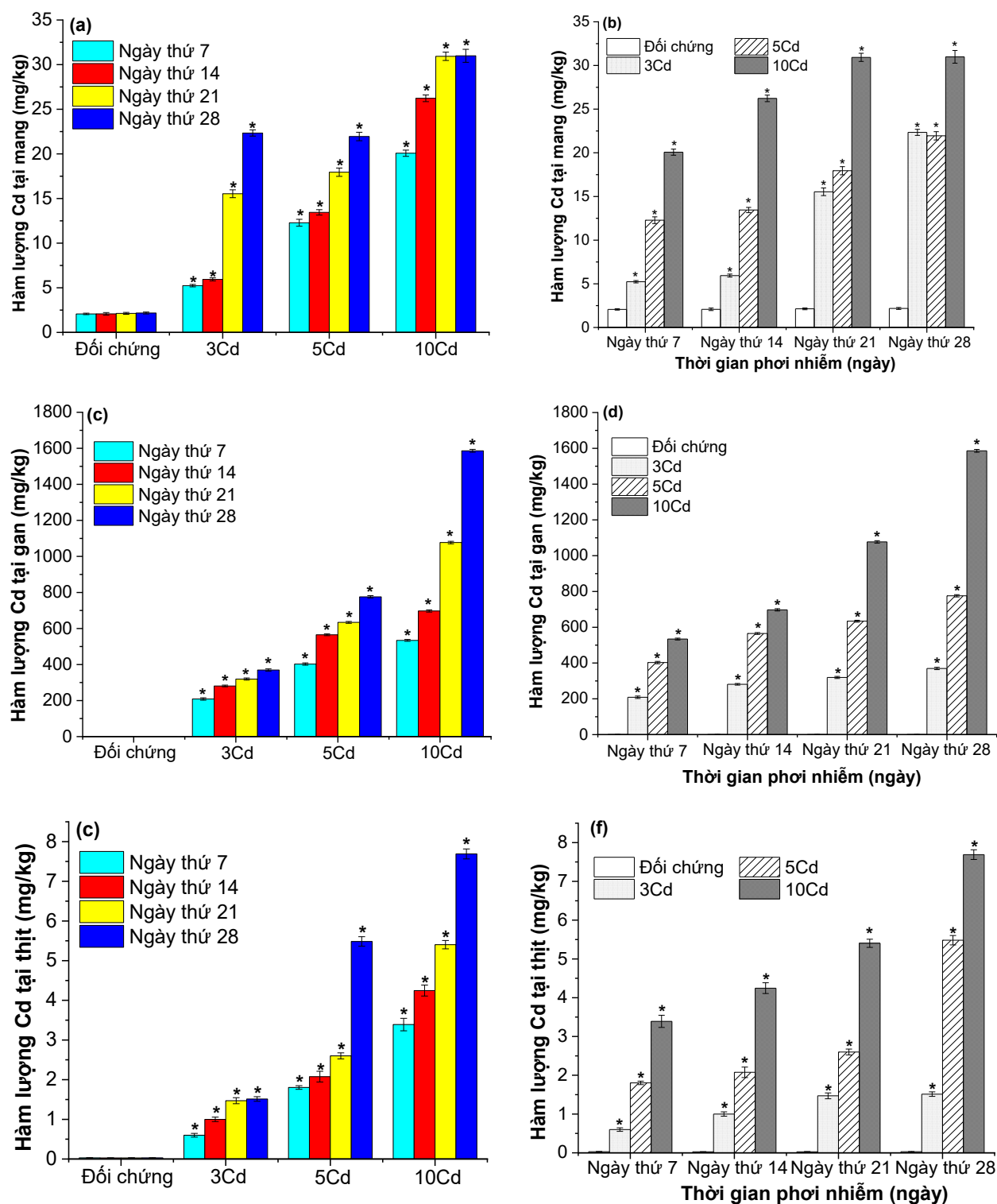
Kết quả tích lũy Cd tại mang, gan và thịt cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm được trình bày trên Hình 3.24 và kết quả xem trong phụ lục 34, 35 và 36. Là một kim loại không thiết yếu, độc hại và khả năng tích tụ sinh học cao, Cd được coi là một trong những kim loại nặng độc hại nhất đối với các sinh vật dưới nước. Kết quả phân tích thông kê (ANOVA, kiểm định LSD) cho thấy, tích lũy Cd tại mang, gan và thịt cá rô đồng phơi nhiễm Cd cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$). Hàm lượng Cd tích tụ ở cá đối chứng từ $2,07 \pm 0,08$ đến $2,18 \pm 0,11$ mg/kg mang khô, $0,34 \pm 0,02$ đến $0,37 \pm 0,04$ mg/kg gan khô và $0,027 \pm 0,003$ đến $0,030 \pm 0,005$ mg/kg thịt khô. Do khả năng tích tụ sinh học cao, hàm lượng Cd tại mang, gan và thịt cá phơi nhiễm Cd tăng nhanh trong thời gian ngắn và cao hơn môi trường nước. Nồng độ Cd trong nước càng cao thì lượng Cd tích tụ ở cá càng nhiều.

Tích tụ Cd tại mang: Ở mang cá rô đồng, tích lũy Cd được tìm thấy thấp nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L ($5,24 \pm 0,14$ mg/kg mang khô) ở ngày thứ 7 và cao nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 10,0 mg/L ($30,99 \pm 0,73$ mg/kg mang khô) ở ngày thứ 28 (Hình 3.24 a&b).

+ Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L, sự tích tụ Cd tại mang được tìm thấy là $5,24 \pm 0,14$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 7; $5,94 \pm 0,17$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 14; $15,54 \pm 0,44$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 21 và $22,34 \pm 0,35$ mg/kg mang khô ở ngày thứ 28. Lượng Cd tại mang của nhóm cá này cao hơn từ 2,53 đến 10,25 lần so với cá đối chứng.

+ Vào các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, lượng Cd tích tụ tại mang của nhóm cá phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L đo được lần lượt là $12,28 \pm 0,39$; $13,45 \pm 0,03$; $17,95 \pm 0,47$ và $21,95 \pm 0,48$ mg/kg mang khô. So với cá đối chứng, lượng Cd tại mang của nhóm cá này cao hơn từ 5,93 đến 10,08 lần.

+ Hàm lượng Cd tại mang của nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L đo được là $20,07 \pm 0,35$; $26,23 \pm 0,38$; $30,93 \pm 0,46$ và $30,99 \pm 0,73$ mg/kg mang khô tương ứng với các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu thí nghiệm. Tích lũy Cd ở mang của nhóm cá này cao hơn từ 9,70 đến 14,50 lần so với cá đối chứng.



Hình 3.24. Tích lũy Cd tại (a)&(b) mang, (c)&(d) gan và (e)&(f) thịt cá rô đồng trong thời gian phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ độ lệch chuẩn, $n=3$);

* Tích lũy Cd tại mang/gan/thịt cá phơi nhiễm Cd cao hơn đáng kể so với cá đối chứng ($p < 0,05$)

Do tiếp xúc trực tiếp với nước nên mang cá là con đường chính để các chất ô nhiễm (kim loại nặng,...) xâm nhập vào bên trong cơ thể. Sau đó, theo máu các kim loại nặng này được vận chuyển đến nội tạng và thịt. Tại mang, Cd được hấp thụ theo kiểu khuếch tán thụ động qua các kênh canxi. Sau đó, Cd được chuyển tích cực vào máu,

rồi đi qua albumin huyết thanh và đến các cơ quan lưu trữ. Cd vô cơ có xu hướng tích tụ đầu tiên trong gan thông qua cơ chế liên kết liên quan đến các protein giải độc như metallothionein (MTs) [132]. Sự tích tụ Cd trong mang là do lượng chất nhầy trên bề mặt mang tăng lên trong quá trình tiếp xúc với Cd [17]. Mang cũng được báo cáo là hoạt động như một kho chứa Cd trong các nghiên cứu thực nghiệm, lượng Cd tích tụ trong mang cá bơn vì (*Paralichthys olivaceus*) là $16,69 \pm 2,13$ và $20,65 \pm 1,51$ mg/kg sau 30 ngày phơi nhiễm Cd nồng độ lần lượt là 50 và 100 mg/L [133, 134]. Lượng Cd trong mang cá rô phi (*Tilapia nilotica*) đo được sau 10 ngày phơi nhiễm Cd nồng độ 0,1 và 1,0 mg/L lần lượt là $14,46 \pm 1,00$ và $25,35 \pm 1,22$ mg/kg chất khô [135].

Tích tụ Cd tại gan: Hình 3.24 c&d cho thấy, sự tích tụ Cd tại gan cá rô đồng được tìm thấy thấp nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm 3Cd ($208,84 \pm 6,87$ mg/kg gan khô) ở ngày thứ 7 và cao nhất đối với nhóm cá phơi nhiễm 10Cd ($1586,10 \pm 8,07$ mg/kg gan khô) ở ngày thứ 28. Gan là nơi chính để tích lũy sinh học, lưu trữ và giải độc chất độc, đó là lý do tại sao nồng độ Cd được tìm thấy tương đối cao.

+ Sự tích tụ Cd tại gan của nhóm cá phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L đo được ở các ngày thứ 7; 14; 21 và 28 lần lượt là $208,84 \pm 6,87$; $281,15 \pm 4,63$; $319,41 \pm 6,03$ và $396,60 \pm 6,36$ mg/kg gan khô, cao hơn so với nhóm cá đối chứng từ 580,11 đến 1017,27 lần.

+ Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L, sự tích tụ Cd tại gan được tìm thấy là $402,78 \pm 6,55$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 7; $656,15 \pm 4,95$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 14; $633,94 \pm 5,15$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 21 và $775,94 \pm 6,33$ mg/kg gan khô ở ngày thứ 28. Lượng Cd tại gan nhóm của nhóm cá này cao hơn so với cá đối chứng là 1118,82 đến 2135,63 lần.

+ Vào các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, lượng Cd tích tụ tại gan của cá rô đồng phơi nhiễm Cd 10,0 mg/L được tìm thấy lần lượt là $534,11 \pm 5,20$; $697,44 \pm 6,35$; $1077,08 \pm 6,87$ và $1586,10 \pm 8,07$ mg/kg gan khô, cao hơn từ 1483,65 đến 4365,44 lần so với cá đối chứng.

Gan cá được xem là một chỉ thị sinh học quan trọng để theo dõi tình trạng nước ô nhiễm kim loại nặng bởi vì gan tích tụ kim loại nặng cao hơn các bộ phận khác và sự tích tụ kim loại nặng ở gan thường tỷ lệ thuận với nồng độ kim loại nặng trong nước [136]. Sự tích tụ sinh học của kim loại ở gan có thể liên quan đến chức năng chuyển hóa của gan, tức là các quá trình hóa học diễn ra bên trong một cơ thể sống để duy trì sự sống [137]. Lượng Cd tích tụ ở gan cá mè (*Puntius gonionotus*) sau 4 tuần phơi nhiễm Cd là 35,8 mg/kg [138].

Tích tụ Cd tại thịt: Trên Hình 3.24 e&f thể hiện mức kim loại nặng trong cơ thể cá có liên quan đến nồng độ kim loại nặng được cá hấp thụ từ nước. Giống như mang

và gan, sự tích tụ Cd tại thịt của cá rô đồng được tìm thấy thấp nhất đối với nhóm cá 3Cd ($0,60 \pm 0,05$ mg/kg thịt khô) ở ngày thứ 7 và cao nhất đối với nhóm cá 10Cd ($7,69 \pm 0,13$ mg/kg thịt khô) ở ngày thứ 28.

+ Đối với nhóm cá 3Cd, sự tích tụ Cd tại thịt được tìm thấy là $0,60 \pm 0,05$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 7; $1,00 \pm 0,06$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 14; $1,47 \pm 0,08$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 21 và $1,51 \pm 0,06$ mg/kg thịt khô ở ngày thứ 28. Tích tụ Cd tại thịt của nhóm cá này cao hơn từ 20,22 đến 51,60 lần so với cá đối chứng.

+ Còn với nhóm cá 5Cd hàm lượng Cd đo được ở các ngày thứ 7; 14; 21 và 28 lần lượt là $1,80 \pm 0,05$; $2,08 \pm 0,14$; $2,60 \pm 0,08$ và $5,48 \pm 0,12$ mg/kg thịt khô, cao hơn từ 60,78 đến 186,95 lần so với cá đối chứng.

+ Cuối cùng lượng Cd tích tụ ở thịt của nhóm cá 10Cd được tìm thấy vào các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm lần lượt là $3,39 \pm 0,16$; $4,25 \pm 0,14$; $5,40 \pm 0,11$ và $7,69 \pm 0,13$ mg/kg thịt khô, cao hơn từ 114,26 đến 262,19 lần so với cá đối chứng.

Bên cạnh sự tích tụ Cd ở các mô như mang, gan và thận, thịt cá cũng được báo cáo là có tích lũy Cd so với các bộ phận khác trong các nghiên cứu thực nghiệm. Sự tích tụ Cd ở thịt thấp là do thịt không tích tụ kim loại nặng một cách chủ động. Hàm lượng Cd tích tụ tại thịt cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) sau 3 tuần phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L là $0,179 \pm 0,005$ mg/kg [134, 139].

Kết quả so sánh sự tích tụ Cd giữa gan – mang, gan – thịt và mang – thịt trong Bảng 3.5 cho thấy Cd tập trung ở gan cá rô đồng nhiều hơn so với mang và thịt.

Bảng 3.5. Tỷ lệ hàm lượng Cd tích lũy tại gan – mang, gan – thịt và mang – thịt

		Đối chứng	3Cd	5Cd	10Cd
Tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{mang}}$	Ngày thứ 7	0,2	39,9	32,8	26,6
	Ngày thứ 14	0,2	47,3	42,0	26,6
	Ngày thứ 21	0,2	20,6	35,5	34,8
	Ngày thứ 28	0,2	16,5	35,4	51,2
Tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{thịt}}$	Ngày thứ 7	12,1	348,1	223,4	157,6
	Ngày thứ 14	12,7	281,2	272,1	164,2
	Ngày thứ 21	13,2	217,3	243,8	199,3
	Ngày thứ 28	12,4	244,2	141,5	206,3
Tỷ lệ $Cd_{\text{mang}}/Cd_{\text{thịt}}$	Ngày thứ 7	69,8	8,7	6,8	5,9
	Ngày thứ 14	77,0	5,9	6,5	6,2
	Ngày thứ 21	76,2	10,6	6,9	5,7
	Ngày thứ 28	74,2	14,8	4,0	4,0

- So sánh sự tích tụ Cd giữa gan và mang của nhóm cá đối chứng, tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{mang}}$ là 0,2 cho thấy Cd tập trung ở mang gấp 5 lần so với ở gan.

+ Lượng Cd tại gan cá rô đồng phơi nhiễm Cd 3 mg/L cao hơn so với mang cá từ 16,5 đến 47,3 lần. Ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm, lượng Cd tập trung ở gan cao gấp 39,9 lần so với Cd tập trung ở mang. Ngày thứ 14, Cd tập trung ở gan cao gấp 47,3 lần so với ở mang. Bởi vì sự tích tụ Cd trong mang cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L sau ngày thứ 14 tăng lên đáng kể, vì vậy tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{mang}}$ giảm và lượng Cd tập trung ở gan cao gấp 16,5 lần so với Cd tập trung ở mang vào ngày thứ 28.

+ Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L, ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu thí nghiệm, lượng Cd tập trung tại gan cao gấp 32,8 lần so với mang. Ngày thứ 14, lượng Cd ở gan cá cao gấp 42,0 lần so với mang. Sau ngày thứ 14, sự tích tụ Cd trên mang tăng lên cao, tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{mang}}$ đạt đến mức khoảng từ 35,4 đến 35,5 lần.

+ Đối với nhóm cá rô đồng phơi nhiễm Cd 10 mg/L, trong 14 ngày đầu tiên kể từ lúc bắt đầu thí nghiệm, tích lũy Cd ở gan cao gấp 26,6 lần so với mang khoảng 26,6 lần. Sau ngày thứ 14, lượng Cd tích lũy tại gan tăng lên tương đối cao hơn, vì vậy tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{mang}}$ thu được ở ngày thứ 21 và 28 lần lượt là 34,8 và 51,2 lần. Tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{mang}}$ tăng cho thấy kéo dài thời gian phơi nhiễm Cd nồng độ cao (10 mg/L) đã làm tăng lượng Cd xâm nhập vào bên trong cơ thể điều này dẫn đến Cd tích lũy nhiều tại gan.

So sánh sự tích tụ Cd giữa gan và thịt của nhóm cá đối chứng, tỷ lệ $Cd_{\text{gan}}/Cd_{\text{thịt}}$ là từ 12,1 đến 13,2, kết quả này cho thấy Cd tập trung ở gan cao hơn so với ở thịt từ 12,1 đến 13,2 lần.

Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd (3-10 mg/L), lượng Cd tập trung tại gan cao gấp 141,5 đến 348,1 lần. Gan cá là cơ quan lưu trữ kim loại, phân phối lại và giải độc kim loại thông qua các protein liên kết kim loại như metallothioneins [84, 140, 141]. Các metallothioneins được biết là có liên quan trực tiếp đến việc hấp thụ, lưu trữ và bài tiết kim loại [142]. Tương tự, một số nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng sự tích tụ kim loại trong gan cá cao hơn so với trong thịt cá [143-145], điều này có lẽ là do các hoạt động trao đổi chất của gan cao [146]. Những kết quả này phù hợp với giả thuyết rằng sự tích tụ trong thịt chỉ trở nên quan trọng khi khả năng dự trữ của gan đạt đến mức tối đa.

Kết quả trong bảng 3.5 cho thấy, sự tích tụ Cd trên mang của nhóm cá đối chứng nhiều hơn trong thịt từ 69,8 đến 77,0 lần. Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd (3,0-10,0 mg/L), tích tụ Cd trên mang nhiều trong thịt từ 4,0 đến 14,8 lần. Trong đó, tích lũy Cd ở mang của nhóm cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L cao hơn ở thịt khoảng từ 5,9 đến 14,8 lần.

Kéo dài thời gian phơi nhiễm Cd 3 mg/L có thể đã làm cho tích lũy Cd trên mang nhiều hơn ở thịt, kết quả là tỷ lệ $\frac{Cd_{mang}}{Cd_{thịt}}$ tăng. Tích lũy Cd trên mang cao hơn ở thịt từ 4,0 đến 6,8 lần đối với cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L và khoảng từ 4,0 đến 5,9 lần đối với cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L. Kéo dài thời gian phơi nhiễm Cd 5 và 10 mg/L có thể tích lũy Cd ở thịt tăng nhiều hơn so với tại mang, kết quả làm tỷ lệ $\frac{Cd_{mang}}{Cd_{thịt}}$ giảm. Mang cá là bộ phận kết nối trực tiếp giữa nước và máu. Nhờ có diện tích bề mặt rất rộng nên mang đẩy nhanh quá trình khuếch tán và lưu giữ nhiều kim loại nặng [147, 148]. Cd tích tụ ở mang có thể được vận chuyển qua hệ thống tuần hoàn đến các mô (thịt, gan và thận), gây ra sự tích tụ.

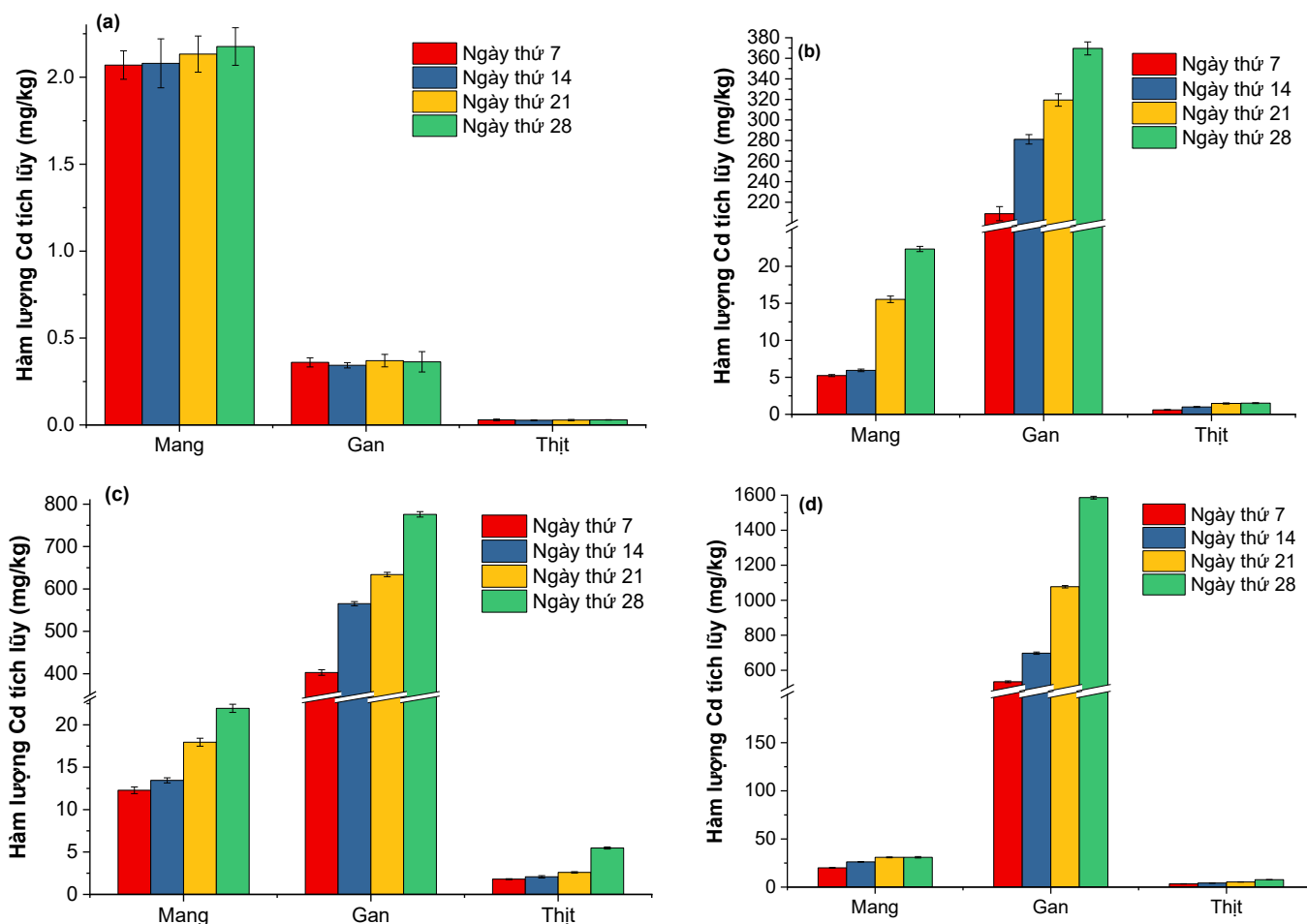
Sự phân bố và tích lũy Cd ở mang, gan và thịt trong cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.25. Ở cá đối chứng sự phân bố này theo thứ tự: Mang >> Gan > Thịt. Tuy nhiên đối với nhóm cá rô đồng phơi nhiễm, sự tích tụ Cd nổi bật nhất ở gan và mang cá. Sự phân bố Cd ở nhóm cá này lại theo thứ tự Gan >> Mang > Thịt. Các kết quả tương tự đã được báo cáo đối với cá chép (*Cyprinus carpio*) và cá rô phi (*Tilapia*) phơi nhiễm Cd 0,5 mg/L trong 30 ngày [149], cá da trơn (*Silurus meridionalis*) phơi nhiễm Cd (62,2 – 500 µg/L) trong 56 ngày [150], cá chạch (*Paramisgurnus dabryanus*) và cá vàng (*Carassius aratus*) phơi nhiễm Cd (16 – 32 mg/kg) [151], cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) phơi nhiễm Cd (0,5 – 3,0 mg/L) trong 3 tuần [139].

Tuy gan là cơ quan chuyển hóa chính để xử lý Cd trong cơ thể sống nhưng những hiểu biết của giới khoa học về các chất vận chuyển Cd và cơ chế phân tử liên quan đến quá trình hấp thụ Cd ở gan vẫn còn hạn chế. Các nghiên cứu trên các tế bào gan riêng lẻ và dòng tế bào gan đã chứng minh có hai con đường hấp thụ Cd ở gan có thể xảy ra: đường thứ nhất là dạng ion của Cd (Cd^{2+}), đường thứ hai là dạng phức hợp của Cd^{2+} .

Có thể Cd^{2+} được hấp thụ bởi các chất vận chuyển kim loại giống các tế bào gan sử dụng để hấp thụ các kim loại thiết yếu (như Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} và Cu^{2+}). Khi gan bị nhiễm độc Cd bán trường diễn hoặc nhiễm độc trường diễn sẽ có những thay đổi rõ rệt về chức năng và hình thái do việc tạo nên các liên kết Cd-MTs sẽ làm bất hoạt nhiều enzyme ngăn ngừa căng thẳng oxy hóa. Hơn nữa, cả MTs liên kết với Cd và GSH đều có thể được giải phóng vào tuần hoàn và mật, thông qua quá trình đẩy Cd-GSH và giải phóng Cd-MTs.

Thêm vào đó đã có những nghiên cứu chứng tỏ khả năng Cd cạnh tranh với Ca ở nhiều vị trí là do Cd và Ca đều là ion kim loại hóa trị hai và có bán kính tương tự nhau (Cd^{2+} là 0,097 nm và Ca^{2+} là 0,099 nm) thêm vào đó Cd^{2+} có ái lực liên kết anion cao hơn Ca^{2+} nên khả năng vận chuyển Cd xuyên biểu mô xảy ra thông qua trung gian của các cơ chế vận chuyển như Ca-ATPase. Còn trong tế bào, Cd cạnh tranh với Ca

đối với các protein liên kết và tích tụ trong mô canxi hóa bao gồm cả các thành phần xương [152-154]



Hình 3.25. Sự phân bố và tích lũy Cd trong cá rô đồng đối chứng và phơi nhiễm Cd (a) Đối chứng, (b) 3Cd, (c) 5Cd và (d) 10Cd

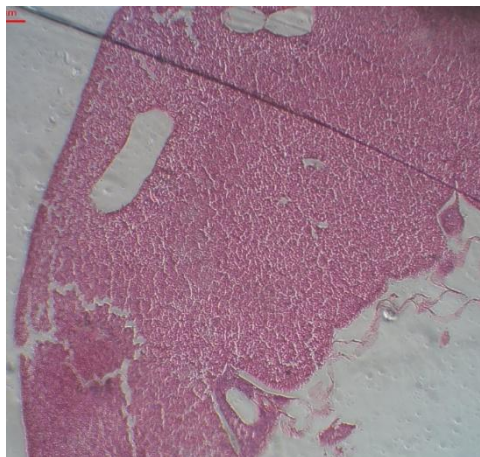
Tích tụ quá nhiều Cd ở gan đã gây ra nhiều thay đổi bệnh lý khác nhau trong mô gan bao gồm tắc nghẽn mạch máu, sung huyết, hoại tử tế bào tụy và thay đổi chất béo trong tế bào gan quanh tụy [155]. Mức độ tổn thương của gan cá rô đồng phơi nhiễm Cd được mô tả trên hình 3.26. Gan cá rô đồng đối chứng nguyên vẹn và màu hồng trong khi gan cá phơi nhiễm Cd màu nhạt, sung huyết và dễ vỡ.



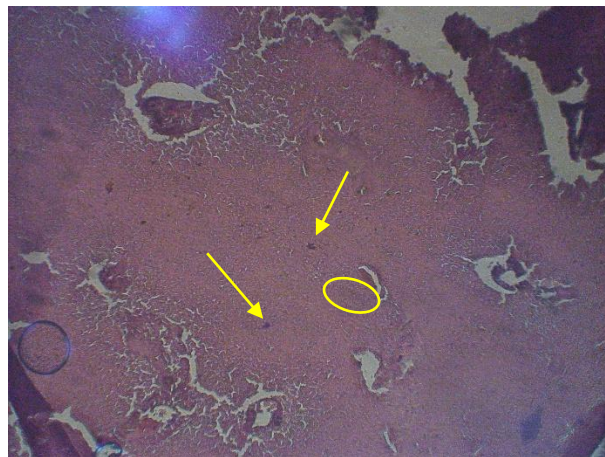
Gan cá đối chứng



Gan cá sau 28 ngày phơi nhiễm 10Cd

Hình 3.26. Gan cá đối chứng và gan cá tổn thương sau 28 ngày phơi nhiễm 10Cd

Gan cá đối chứng



Gan cá sau 28 ngày phơi nhiễm 10Cd

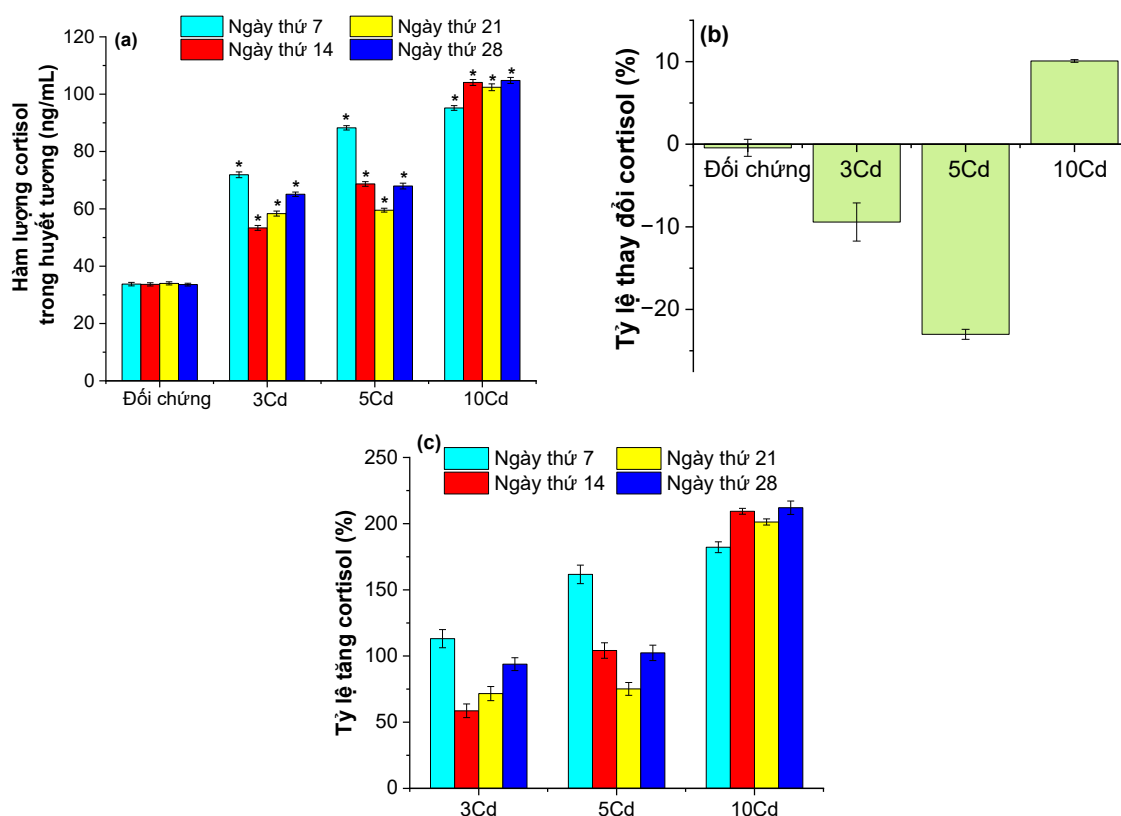
Hình 3.27. Mô học của gan cá đối chứng và gan cá tổn thương sau 28 ngày phơi nhiễm 10Cd

Về mô học của gan nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L trong 28 ngày có thể quan sát thấy ngoài những vết màu đỏ sậm trong mô gan cá phơi nhiễm (mũi tên màu vàng) có thể là do sự rò rỉ các tế bào máu ra khỏi tĩnh mạch trung tâm còn có sự sít chặt trong sắp xếp các tế bào gan, không còn trật tự trong tế bào gan như ở mô gan nhóm cá đối chứng. Điều này có thể cho thấy khi sống trong môi trường phơi nhiễm Cd gan cá bị hoại tử ở mức độ cao. Tổn thương lớn nhất ở mô gan được ghi nhận trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) khi phơi nhiễm CdCl_2 ở nồng độ 10 mg/L là sự thâm nhiễm nặng của tế bào lympho, đại thực bào và tế bào gan bị chuyển hóa thành không bào. Việc hình thành không bào được cho là một cơ chế bảo vệ tế bào của tế bào gan chống lại các chất ô nhiễm bằng cách tích tụ chúng trong các không bào, điều này cũng gây nên việc đẩy nhân ở vị trí trung tâm ra ngoài vi của tế bào gan. Bên cạnh đó sự thay đổi đáng chú ý ở gan còn là hạt nhân tế bào gan sẫm màu hơn, tế bào gan có dạng bất

thường với mao mạch máu giãn nở, điều này có thể giải thích cho màu sắc của mô gan cá đối chứng là màu hồng sáng thì mô gan cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L trong nghiên cứu có màu hồng sậm [98].

c. Tác động độc tính bán trường diễn của Cd đến sự thay đổi cortisol trong huyết tương cá rô đồng

Ảnh hưởng của Cd đến sự thay đổi cortisol trong huyết tương của cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.28 và kết quả được trình bày trong Phụ lục 37. Phân tích phương sai một chiều (ANOVA), kiểm nghiệm LSD cho thấy nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng phơi nhiễm Cd cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với cá đối chứng.



Hình 3.28. (a) Sự thay đổi nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Cd; (b) Tỷ lệ thay đổi cortisol trong máu cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Cd và (c) Tỷ lệ tăng cortisol trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng

(Giá trị chính $\pm$ SD, $n = 3$);

*Sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về nồng độ cortisol trong máu cá đối chứng và cá phơi nhiễm Cd

- Nồng độ cortisol trong huyết tương cá đối chứng dao động khoảng từ $33,59 \pm 0,48$ đến $34,00 \pm 0,56$ ng/mL. Tác động tiêu cực của Cd đối với cá rô đồng là gây căng thẳng tăng sinh cortisol và nồng độ Cd trong nước càng cao càng gây tăng sinh cortisol. Phơi nhiễm Cd lâu dài gây rối loạn tiết cortisol, dẫn đến mức cortisol trong huyết tương cá rô đồng thay đổi bất thường.

- Cortisol trong huyết tương của nhóm cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L tăng cao tại ngày thứ 7 ($71,88 \pm 1,02$ ng/mL), gấp 2,1 lần so với cá đối chứng. Nồng độ cortisol đo được tại ngày thứ 14 giảm so với ngày thứ 7, sau đó tăng nhẹ đến ngày thứ 28. Mặc dù nồng độ cortisol trong huyết tương cá tăng tại ngày thứ 21 và 28 nhưng vẫn thấp hơn so với ngày thứ 7. Kết quả trên Hình 3.28a cho thấy, nồng độ cortisol đo được tại ngày thứ 14, 21 và 28 lần lượt là $53,36 \pm 0,86$; $58,34 \pm 0,87$ và $65,10 \pm 0,75$ ng/mL, cao hơn so với cá đối chứng từ 1,6 đến 1,9 lần. Với nhóm cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L, nồng độ cortisol trong huyết tương tăng cao tại ngày thứ 7 và giảm dần đến ngày thứ 21 sau đó tăng lên ở ngày thứ 28. Mặc dù, nồng độ cortisol trong huyết tương cá rô đồng từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 21 giảm so với ngày thứ 7 kể từ lúc phơi nhiễm, nhưng vẫn cao hơn đáng kể so với cá đối chứng. Nồng độ cortisol trong huyết tương cá đo được tại ngày thứ 28 tăng cao nhưng vẫn thấp hơn so với ngày thứ 7. Nồng độ cortisol trong huyết tương nhóm cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L đo được tại ngày thứ 7 và ngày thứ 14 lần lượt là $88,26 \pm 0,75$ và $68,68 \pm 0,81$ ng/mL, cao gấp 2,6 và 2,0 lần so với nồng độ cortisol trong huyết tương cá đối chứng. Nồng độ cortisol đo được ở ngày thứ 21 và 28 lần lượt là $59,53 \pm 0,68$ và $67,95 \pm 1,01$ ng/mL cao hơn so với cá đối chứng từ 1,8 đến 2,0 lần.

Hình 3.28a cũng cho thấy, nồng độ cortisol trong huyết tương của nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L tăng cao đến ngày thứ 14 sau đó gần như không đổi cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Nồng độ cortisol đo được trong huyết tương tại ngày thứ 7 và ngày thứ 14 lần lượt là $95,19 \pm 0,84$ và $104,09 \pm 1,05$ ng/mL, cao gấp 2,8 và 3,1 lần so với cá đối chứng. Lượng cortisol đo được tại ngày thứ 21 và 28 lần lượt là $102,42 \pm 1,18$ và $104,78 \pm 1,05$, gấp từ 3,0 đến 3,1 lần so với cá đối chứng.

Hình 3.28b trình bày tỷ lệ giảm cortisol trong huyết tương cá giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm. Bởi vì sự chênh lệch về nồng độ cortisol giữa ngày thứ 28 và ngày thứ 7 không đáng kể nên tỷ lệ cortisol trong huyết tương cá đối chứng chỉ giảm khoảng $0,44 \pm 1,03$ %. Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 3 và 5 mg/L, nồng độ cortisol trong huyết tương ngày thứ 28 thấp hơn so với ngày thứ 7, với tỷ lệ giảm lần lượt $9,43 \pm 0,24$ và $23,01 \pm 0,60$ %. Đáng chú ý, nồng độ cortisol trong huyết tương nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L ngày thứ 28 tăng $10,08 \pm 0,16$ % so với ngày thứ 7.

Hình 3.28c trình bày tỷ lệ tăng sinh cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng. So với cá đối chứng, nồng độ cortisol trong huyết tương cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L tăng $113,14 \pm 6,86$ % ở ngày thứ 7, $58,62 \pm 5,17$ % ở ngày thứ 14, $71,65 \pm 5,32$ % ở ngày thứ 21, và $93,86 \pm 4,84$ % ở ngày thứ 28. Nồng độ cortisol trong nhóm cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L đo được tại các ngày thứ 7, 14, 21 và 28 cao hơn

so với cá đối chứng lần lượt $161,69 \pm 6,97$; $104,16 \pm 5,83$; $75,13 \pm 4,85$ và $102,38 \pm 5,81$ %. Nồng độ cortisol trong nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L cao hơn so với cá đối chứng là $182,20 \pm 4,09$ % ở ngày thứ 7, $209,32 \pm 2,21$ % ở ngày thứ 14, $201,25 \pm 2,34$ % ở ngày thứ 21 và $212,02 \pm 5,06$ % ở ngày thứ 28. Những phát hiện này chỉ ra rằng Cd ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động tuyến thượng thận, gây rối loạn giải phóng cortisol. Vì vậy, lượng cortisol trong huyết tương cá rô đồng thay đổi tăng, giảm liên tục và kéo dài cho đến khi kết thúc thời gian sống trong nước ô nhiễm Cd (28 ngày).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng trục hạ đồi - tuyến yên - liên thận (HPI) bị kiệt quệ là một hiện tượng phổ biến ở cá tiếp xúc lâu dài với tác nhân gây căng thẳng. Sự gia tăng nồng độ cortisol kéo dài có thể dẫn đến phản hồi tiêu cực trên trục HPI, nơi tuyến yên và vùng dưới đồi bị ức chế. Phản hồi tiêu cực liên tục có thể làm giảm giải phóng ACTH (hormone vỏ thượng thận), dẫn đến giảm sản xuất cortisol và có khả năng teo tế bào trong tuyến yên và vỏ thượng thận [108]. Sự tăng lượng cortisol trong máu đã được tìm thấy đối với cá chình nước ngọt *Anguilla rostrata* (Lesueur) và cá rô phi đen (*Oreochromis mossombicus*) phơi nhiễm Cd [116, 156, 157]. Ngược lại, Cd gây căng thẳng giảm sinh cortisol đối với cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) và cá điêu hồng (*Oreochromis sp*) [158, 159]. Không có dấu hiệu rối loạn cortisol đối với cá hồi Đại Tây Dương (*Salmo salar*) và cá chép (*Cyprinus carpio*) phơi nhiễm Cd [160, 161].

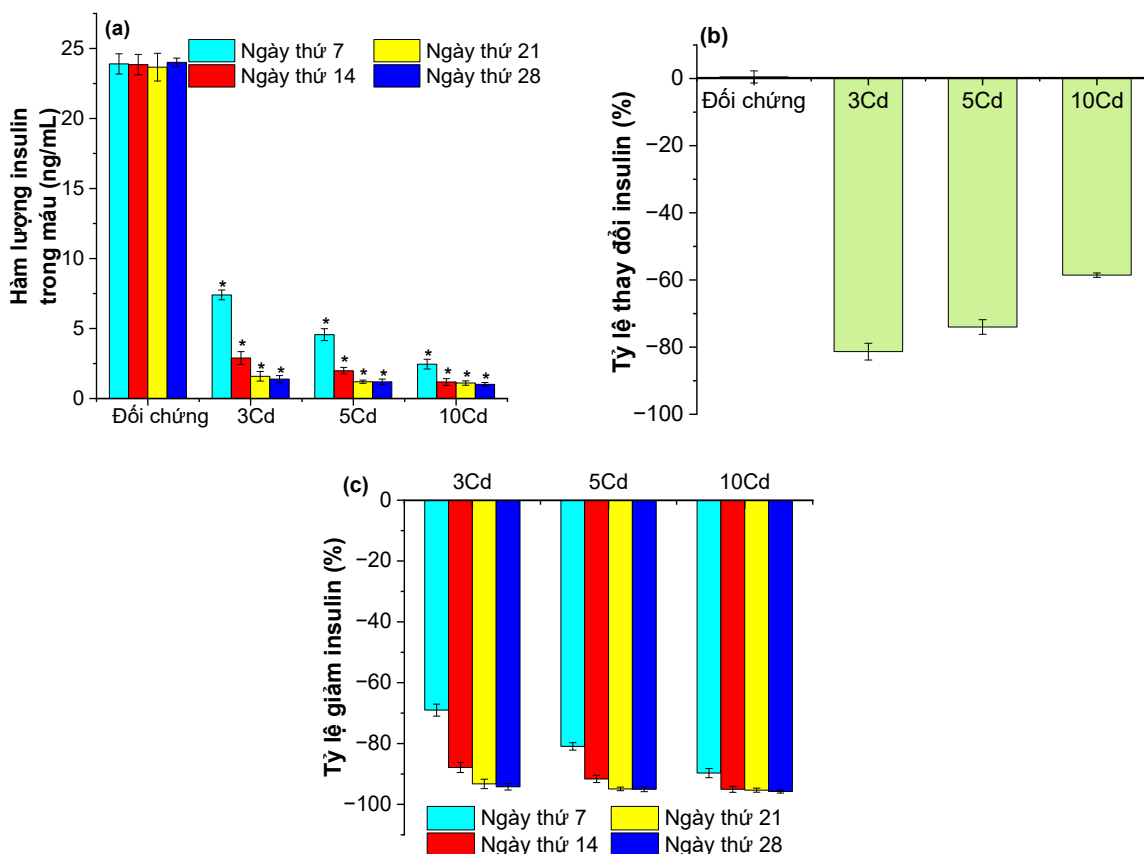
✚ Sự rối loạn tiết cortisol đối với cá rô đồng phơi nhiễm Cd của nghiên cứu này cho thấy, tiếp xúc lâu dài với Cd có thể dẫn đến phản hồi tiêu cực trên trục HPI và cuối cùng gây ra sự kiệt sức của trục HPI.

d. Tác động độc tính bán trường diễn của Cd đến sự thay đổi insulin trong máu cá rô đồng

Ảnh hưởng của Cd đến sự thay đổi nồng độ insulin trong máu của cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.29a và kết quả được trình bày trong Phụ lục 38. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, nồng độ insulin trong máu cá rô đồng phơi nhiễm Cd thấp hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với cá đối chứng. Nồng độ insulin trong máu cá đối chứng dao động khoảng từ $23,67 \pm 0,99$ đến $24,01 \pm 0,31$ ng/mL.

Cd là một kim loại không thiết yếu, không có chức năng sinh học và rất độc cho động vật thủy sinh. Căng thẳng độc hại do Cd gây ra đối với cá rô đồng là giảm sản xuất insulin và tiếp xúc lâu dài với Cd nồng độ càng cao thì lượng insulin trong máu càng thấp. Hình 3.29a cho thấy tình trạng cạn kiệt insulin đối với cá phơi nhiễm Cd. Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L, nồng độ insulin đo được ở ngày thứ 7 và ngày thứ 14 lần lượt là $7,40 \pm 0,35$ và $2,90 \pm 0,46$ ng/mL, giảm 3,2 và 10,4 lần so với nồng độ insulin của cá đối chứng. Nồng độ insulin đo được ở ngày thứ 21 và ngày thứ 28 lần lượt là $1,59 \pm 0,34$ và $1,39 \pm 0,25$ ng/mL. So với cá đối chứng, nồng độ insulin

của cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L giảm 14,9 lần ở ngày thứ 21 và giảm 17,3 lần ở ngày thứ 28. Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L, nồng độ insulin đo được ở ngày thứ 7 và ngày thứ 14 lần lượt là $4,56 \pm 0,43$ và $1,99 \pm 0,24$ ng/mL, giảm 5,2 và 12 lần so với nồng độ insulin của cá đối chứng. Kéo dài thời gian tiếp xúc với Cd, nồng độ insulin càng thấp. Ngày thứ 21 và ngày thứ 24, nồng độ insulin đo được lần lượt là $1,20 \pm 0,12$ và $1,19 \pm 0,20$ ng/mL, giảm 19,7 và 20,2 lần so với nồng độ insulin của cá đối chứng. Nồng độ insulin trong máu nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L đo được ở ngày thứ 7 và ngày thứ 14 lần lượt là $2,46 \pm 0,35$ và $1,18 \pm 0,24$ ng/mL. So với cá đối chứng, nồng độ insulin của cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L giảm 9,7 lần ở ngày thứ 7 và giảm 20,2 lần ở ngày thứ 14. Nồng độ insulin đo được ở ngày thứ 21 và ngày thứ 28 lần lượt là $1,11 \pm 0,16$ và $1,02 \pm 0,13$ ng/mL, giảm 21,32 và 23,5 lần so với insulin của cá đối chứng.



Hình 3.29. (a) Sự thay đổi nồng độ insulin trong máu cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Cd; (b) Tỷ lệ thay đổi insulin trong máu cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Cd và (c) Tỷ lệ giảm insulin trong máu của cá rô đồng phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng

(Giá trị chính $\pm$ SD, n = 3);

*Sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về lượng insulin trong máu cá đối chứng và cá phơi nhiễm Cd

Hình 3.29b trình bày tỷ lệ thay đổi insulin trong máu cá giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm. Bởi vì sự chênh lệch về nồng độ insulin giữa ngày thứ 28 và ngày thứ 7 không đáng kể nên tỷ lệ insulin trong máu cá đối chứng tăng

khoảng $0,50 \pm 1,80$ %. Đối với cá rô đồng phơi nhiễm Cd 3 và 5 mg/L, nồng độ insulin trong máu đo được tại ngày thứ 28 thấp hơn đáng kể so với ngày thứ 7, với tỷ lệ giảm lần lượt $81,34 \pm 2,49$ và $74,00 \pm 2,18$ %. Tỷ lệ giảm insulin trong máu cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L của ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 là $58,56 \pm 0,64$ %. Cá rô đồng sống trong nước ô nhiễm Cd nồng độ càng cao thì sự lượng insulin trong máu càng thấp. Mặc dù, không có cá chết do nhiễm Cd, nhưng sự giảm đáng kể về lượng insulin cho thấy căng thẳng do Cd gây ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động tuyến tụy kết quả là ức chế giải phóng insulin.

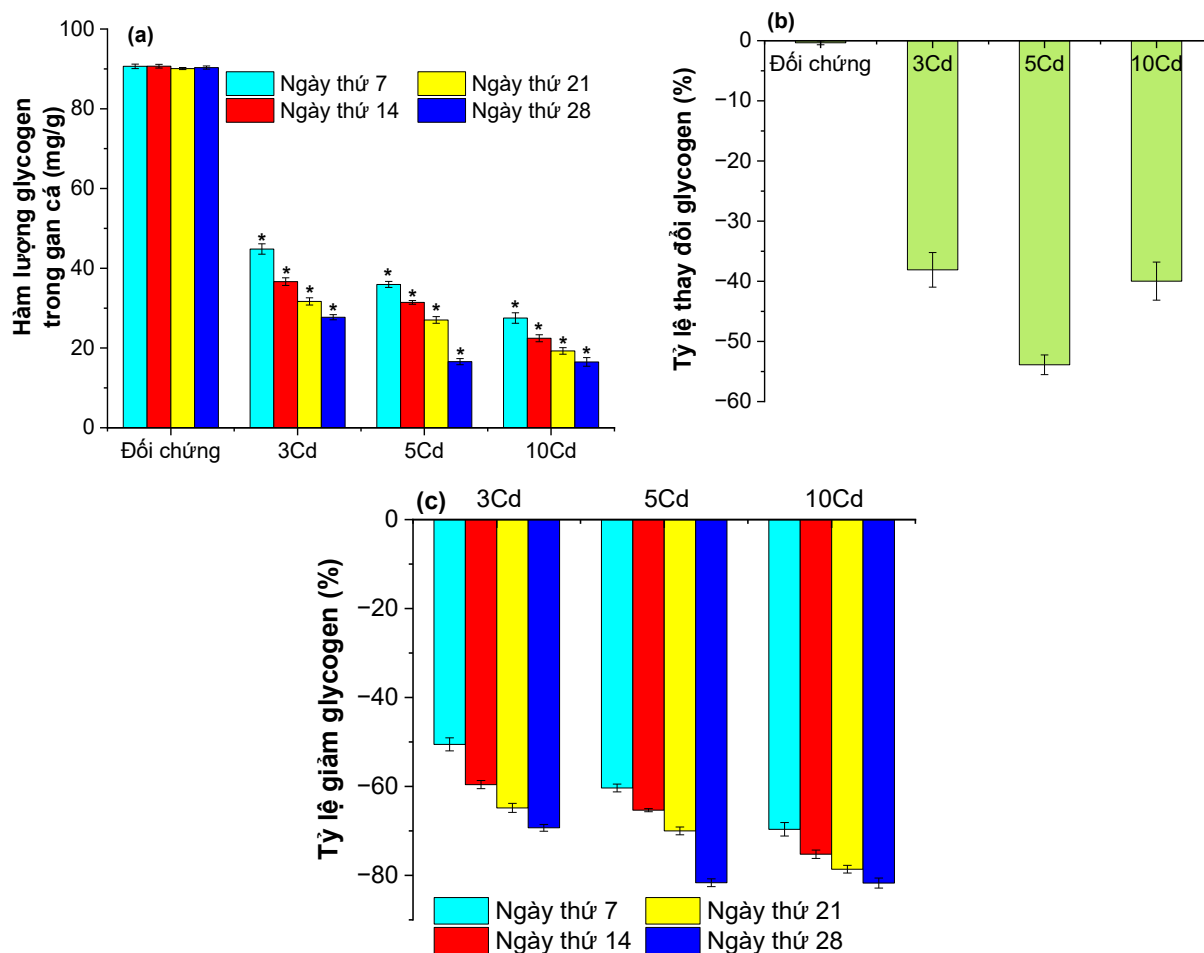
Hình 3.29c trình bày tỷ lệ giảm lượng insulin trong máu cá phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng. So với cá đối chứng, nồng độ insulin trong máu cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L giảm $69,01 \pm 1,97$ % ở ngày thứ 7; giảm $87,87 \pm 1,66$ % ở ngày thứ 14; giảm $93,27 \pm 1,56$ % ở ngày thứ 21 và giảm $94,22 \pm 1,06$ % ở ngày thứ 28. Nồng độ insulin trong máu cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L giảm so với cá đối chứng lần lượt là $80,94 \pm 1,22$; $91,65 \pm 1,20$; $94,92 \pm 0,58$ và $95,05 \pm 0,78$ % tương ứng với các ngày thứ 7; 14; 21 và 28. So với cá đối chứng, nồng độ insulin trong máu cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L giảm $89,71 \pm 1,52$ % ở ngày thứ 7; giảm $95,05 \pm 0,98$ % ở ngày thứ 14; giảm $95,32 \pm 0,68$ % ở ngày thứ 21 và giảm $95,77 \pm 0,52$ % ở ngày thứ 28.

Những phát hiện này chỉ ra rằng Cd ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động tuyến tụy, gây ức chế giải phóng insulin. Carbohydrate trong thức ăn sẽ được cơ thể chuyển hóa thành glucose, đi vào máu. Đây lại là nguyên nhân khởi đầu cho quá trình sản xuất và giải phóng hormone insulin của các tế bào beta của đảo Langerhans của tuyến tụy [162]. Insulin thúc đẩy các cơ quan đích (gan và cơ) hấp thụ glucose để tạo năng lượng hoặc và chuyển đổi nó thành glycogen dự trữ [162]. Căng thẳng do phơi nhiễm Cd kéo dài có thể thúc đẩy tuyến thượng thận giải phóng hormone catecholamine kích thích thụ thể α của tuyến tụy [113], điều này giải thích cho hiện tượng cạn kiệt insulin trong cá phơi nhiễm Cd đến ngày thứ 28.

✚ Các kết quả về sự thay đổi insulin trong máu cá rô đồng của nghiên cứu này cho thấy, tiếp xúc lâu dài với Cd ở nồng độ cao gây ra phản ứng căng thẳng, ảnh hưởng tiêu cực đến hoạt động của tuyến tụy, dẫn đến giảm sản xuất insulin.

e. Tác động độc tính bán trường diễn của Cd đến sự thay đổi glycogen trong gan cá rô đồng

Glycogen là một trong những nguồn năng lượng dự trữ luôn có sẵn cho hoạt động vận động của cơ thể, tình trạng bơi lội kém và phản ứng chậm của cá rô đồng phơi nhiễm Cd có thể là do căng thẳng và thiếu hụt năng lượng dự trữ. Ảnh hưởng của Cd đến sự thay đổi glycogen trong gan cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.30a và kết quả được trình bày trong Phụ lục 39.



Hình 3.30. (a) Sự thay đổi hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng đối chứng và cá rô đồng phơi nhiễm Cd; (b) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá rô đồng giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm Cd và (c) Tỷ lệ giảm glycogen trong gan của cá rô đồng phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng

(Giá trị chính $\pm$ SD, $n = 3$);

*Sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về lượng glycogen trong gan cá đối chứng và cá phơi nhiễm Cd

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) về lượng glycogen trong gan cá rô đồng đối chứng so với cá rô đồng phơi nhiễm Cd. Lượng glycogen trong gan cá rô đồng đối chứng trong 28 ngày thí nghiệm được ghi nhận trong khoảng $90,09 \pm 0,27$ đến $90,69 \pm 0,47$ mg/g. Cá rô đồng tiếp xúc lâu dài với Cd nồng độ càng cao thì lượng glycogen trong gan càng thấp. Vào ngày thứ 7 và ngày thứ 14 kể từ bắt đầu thí nghiệm, lượng glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L đo được $44,83 \pm 1,30$ và $36,65 \pm 0,96$ mg/g, thấp so với cá đối chứng lần lượt là 2,0 và 2,5 lần. Lượng glycogen trong gan đo được vào ngày thứ 21 là $31,68 \pm 0,90$ mg/g, thấp hơn 2,8 lần so với glycogen trong gan cá đối chứng. Vào ngày thứ 28, lượng glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd đo được là $27,72 \pm 0,64$ mg/g, giảm 3,3 lần so với cá đối chứng.

Hình 3.30a cho thấy lượng glycogen trong gan nhóm cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L đo được $35,95 \pm 0,75$ mg/g ở ngày thứ 7, giảm 2,5 lần so với cá đối chứng. Ngày thứ 14, lượng glycogen trong gan đo được là $31,44 \pm 0,46$ mg/g, giảm 2,9 lần so với cá đối chứng. Ngày thứ 21 và 28, lượng glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L đo được lần lượt là $27,03 \pm 0,84$ và $16,58 \pm 0,76$, giảm 3,3 và 5,4 lần so với cá đối chứng. Đối với nhóm cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L, lượng glycogen trong gan đo được ở ngày thứ 7 và ngày thứ 14 lần lượt là giảm $27,52 \pm 1,32$ và $22,45 \pm 0,88$ mg/g, giảm 3,3 và 4,0 lần so với glycogen trong gan cá đối chứng. Lượng glycogen trong gan đo được ở ngày thứ 21 và ngày thứ 28 lần lượt là giảm $19,27 \pm 0,81$ và $16,51 \pm 1,09$ mg/g, giảm 4,7 và 5,5 lần so với cá đối chứng. Sự giảm hàm lượng glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd cho thấy cơ thể đang huy động dự trữ glycogen để đáp ứng nhu cầu năng lượng tăng lên do căng thẳng. Những phát hiện của nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu trước đây.

Sự giảm liên tục hàm lượng glycogen dự trữ trong cá lóc đốm (*C. Perfuscatus*) phơi nhiễm ZnSO_4 dưới mức gây chết cũng đã được báo cáo [116, 117]. Sự cạn kiệt glycogen trong gan của cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) và cá ngựa vằn (*Danio rerio*) phơi nhiễm Cd và Hg cũng đã được báo cáo [163, 164].

Hình 3.30b trình bày tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá giữa ngày thứ 28 so với ngày thứ 7 kể từ lúc bắt đầu phơi nhiễm. Bởi vì sự chênh lệch về hàm lượng glycogen trong gan cá đối chứng giữa ngày thứ 28 và ngày thứ 7 không đáng kể nên tỷ lệ glycogen trong gan cá đối chứng giảm khoảng $0,35 \pm 0,32$ %. Kết quả trên Hình 3.30b cho thấy, lượng glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd đo được tại ngày thứ 28 thấp hơn nhiều so với ngày thứ 7, với tỷ lệ giảm $38,10 \pm 2,88$ % đối với cá phơi nhiễm Cd 3 mg/L, $53,89 \pm 1,64$ % đối với cá phơi nhiễm Cd 5 mg/L và $39,98 \pm 3,16$ % đối với cá phơi nhiễm Cd 10 mg/L.

Hình 3.30c trình bày tỷ lệ giảm glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd so với cá đối chứng. So với gan cá đối chứng, lượng glycogen trong gan cá phơi nhiễm Cd 3 – 10 mg/L giảm từ $50,54 \pm 1,47$ đến $69,64 \pm 1,53$ % tại ngày thứ 7; giảm từ $59,59 \pm 0,91$ đến $75,25 \pm 0,94$ % tại ngày 14, giảm từ $64,83 \pm 1,02$ đến $78,61 \pm 0,87$ % tại ngày 21 và giảm từ $69,31 \pm 0,77$ đến $81,72 \pm 1,13$ % tại ngày 28. Những kết quả này chỉ ra rằng căng thẳng do phơi nhiễm Cd dẫn đến rối loạn chuyển hóa ở gan của cá rô đồng. Nghiên cứu trước đây cho thấy Cd không chỉ ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa năng lượng mà còn gây tổn thương ty thể, là vị trí chuyển hóa năng lượng chính ở trong gan [154]. Do đó, phơi nhiễm Cd có thể phá vỡ quá trình chuyển hóa carbohydrate ở cá, dẫn đến giảm dự trữ glycogen và thay đổi hoạt động của enzyme gan. Kho dự trữ glycogen ở gan là nguồn cung cấp glucose chủ yếu cho máu. Glycogen ở gan có thể bị phá vỡ bằng

cách phân giải thành glucose-6-P và enzyme glucose-6-phosphatase sau đó xúc tác chuyển glucose-6-P thành glucose. Glucose này sau đó có thể được vận chuyển ra khỏi tế bào để cung cấp cho máu [165]. Các phân tử glucose trong máu được các chất vận chuyển glucose đưa vào các tế bào khắp cơ thể, bên trong tế bào glucose có thể bị oxy hóa để tạo năng lượng.

✚ Sự giảm đáng kể glycogen dự trữ ở gan đối với cá rô đồng phơi nhiễm Cd của nghiên cứu này cho thấy, căng thẳng do tiếp xúc với Cd dẫn đến rối loạn chuyển hóa, đòi hỏi cơ thể phải sử dụng glycogen (glucose dự trữ) để tạo năng lượng.

3.3.2.2. Cá rô đồng thôi nhiễm Cd

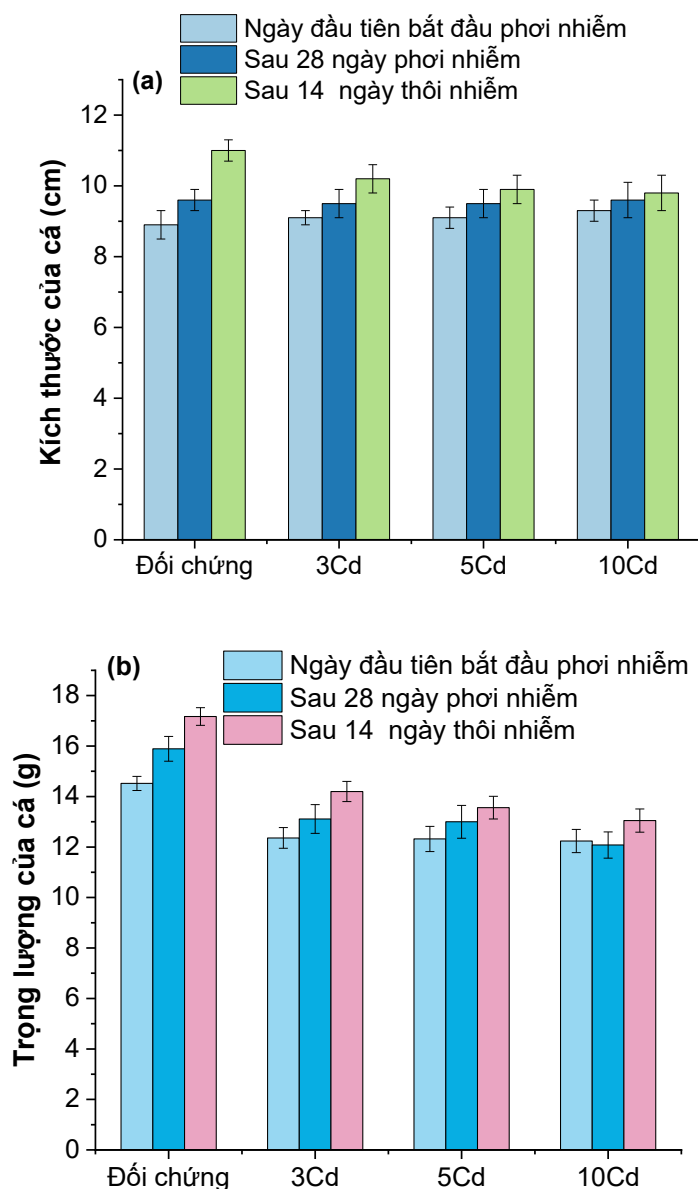
a. Sự thay đổi trọng lượng và kích thước

Sau 14 ngày thôi sống trong nước ô nhiễm Cd, sự thay đổi về kích thước và trọng lượng của cá rô đồng được trình bày trên Hình 3.31 và trong Phụ lục 40.

Sau 42 ngày thí nghiệm bao gồm 28 ngày phơi nhiễm và 14 ngày thôi nhiễm, cá đối chứng vẫn khỏe mạnh, phản ứng nhanh, ăn tốt và phát triển bình thường. So với ngày bắt đầu phơi nhiễm (ngày bắt đầu thí nghiệm), kích thước của cá đối chứng tăng 22,50% và tổng lượng cá đối chứng tăng 18,25 %. Kích thước và trọng lượng của cá đối chứng trong 28 ngày của giai đoạn phơi nhiễm tăng lần lượt là 8,20 và 9,44 %. Kích thước và trọng lượng của cá đối chứng trong 13 ngày của giai đoạn thôi nhiễm tăng lần lượt là 13,20 và 8,06 %. Kết quả này cho thấy điều kiện nuôi là hợp lý và không làm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cá rô đồng.

Tác động tiêu cực của Cd đối với cá rô đồng được thể hiện rõ ràng qua tình trạng phục hồi chậm. Cá rô đồng đã từng phơi nhiễm Cd nồng độ càng cao thì việc tăng trưởng (kích thước, trọng lượng) càng chậm, kể cả khi được sống trong nước sạch. Mặc dù, Cd có ảnh hưởng nhất định đến sức khỏe và khả năng phục hồi của cá rô đồng phơi nhiễm Cd, tuy nhiên sau 3 ngày được sống trong nước sạch thì phản ứng của cá trở nên linh hoạt hơn và ăn nhiều thực phẩm hơn vì vậy kích thước và trọng lượng của cá đã từng phơi nhiễm Cd vẫn có xu hướng tăng.

+ Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L, kích thước và trọng lượng của cá tại ngày thứ 14 giai đoạn thôi nhiễm (ngày kết thúc thí nghiệm) tăng lần lượt là 12,50 và 13,98 % so với kích thước và trọng lượng của cá tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm. Trong đó, giai đoạn phơi nhiễm (28 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 5,30 % và 6,07 %. Giai đoạn thôi nhiễm (14 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 6,80 % và 8,31 %.



Hình 3.31. Sự thay đổi (a) kích thước và (b) trọng lượng của cá rô đồng tại các thời điểm bắt đầu phơi nhiễm và thôi nhiễm Cd, ngày thứ 28 phơi nhiễm và ngày thứ 14 thôi nhiễm

+ Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L, kích thước và trọng lượng của cá trong suốt quá trình thí nghiệm (42 ngày) tăng lần lượt là 7,90 và 10,03 %. Trong đó, giai đoạn phơi nhiễm (28 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 3,60 % và 5,49 %. Giai đoạn thôi nhiễm (14 ngày), kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 4,10 % và 4,31 %.

+ Đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 10,0 mg/L, kích thước và trọng lượng của cá trong 42 ngày thí nghiệm tăng lần lượt là 5,50 và 6,62 %. Trong đó, giai đoạn 28 ngày phơi nhiễm, kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là

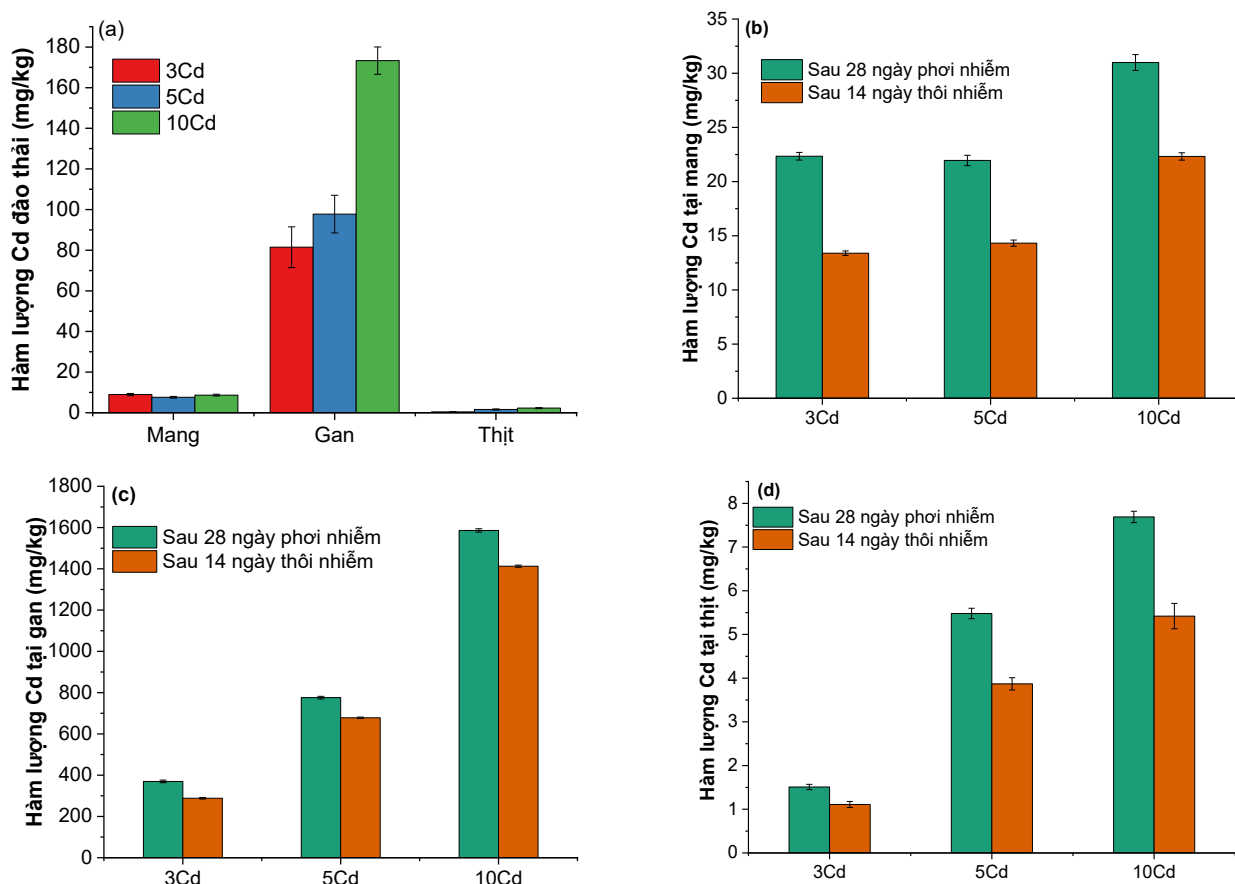
3,00 % và 4,58 %. Giai đoạn 14 ngày thôi nhiễm, kích thước và trọng lượng của nhóm cá này tăng lần lượt là 2,40 % và 1,95 %.

b. Sự đào thải Cd của cá rô đồng ô nhiễm

Sự thay đổi hàm lượng Cd trong mang, gan và thịt cá đã từng phơi nhiễm Cd sau 14 ngày sống trong nước sạch so với hàm lượng Cd tích lũy trong cá khi mới bắt đầu sống trong nước sạch được trình bày trên Hình 3.32 và kết quả thí nghiệm trong Phụ lục 41. Hàm lượng Cd được đào thải ra khỏi mô của cá phơi nhiễm sau 14 ngày sống trong nước sạch được trình bày trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Hàm lượng Cd đào thải ở các mô của cá rô đồng sau 14 ngày thôi nhiễm

Mô cá	Hàm lượng Cd đào thải (mg/kg)		
	3Cd	5Cd	10Cd
Mang	$8,95 \pm 0,56$	$7,63 \pm 0,42$	$8,67 \pm 0,44$
Gan	$81,48 \pm 10,04$	$97,78 \pm 9,28$	$173,33 \pm 6,71$
Thịt	$0,41 \pm 0,06$	$1,62 \pm 0,27$	$2,27 \pm 0,22$



Hình 3.32. Hàm lượng Cd ở mang, gan và thịt của cá rô đồng (a) Lượng Cd được đào thải, (b) Lượng Cd tại mang, (c) Lượng Cd tại gan và (d) Lượng Cd tại thịt ở ngày thứ 28 của giai đoạn phơi nhiễm và ngày thứ 14 của giai đoạn thôi nhiễm

Hàm lượng Cd trong mang, gan và thịt cá đã từng phơi nhiễm Cd giảm tương đối sau 14 ngày sống trong nước sạch. Quá trình đào thải Cd ra khỏi mang, gan và thịt cá sau 28 ngày phơi nhiễm Cd chủ yếu phụ thuộc vào chức năng của từng loại mô.

Đào thải Cd từ mang: Sự đào thải Cd ở mang của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L và Cd 10,0 mg/L nhiều hơn so nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L. Với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 3,0 và 10,0 mg/L hàm lượng đào thải lần lượt là $8,95 \pm 0,56$ mg/kg và $8,67 \pm 0,44$ mg/kg trong khi nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L là $7,63 \pm 0,42$ mg/kg.

Đào thải Cd từ gan: Sự đào thải Cd ở gan của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 10,0 mg/L là nhiều nhất, tiếp theo là nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L và cuối cùng là nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L. Hàm lượng đào thải Cd ra khỏi gan là $173,33 \pm 6,71$; $97,78 \pm 9,28$ và $81,48 \pm 10,04$ mg/kg lần lượt tương ứng với các nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 10,0; 5,0 và 3,0 mg/L

Đào thải Cd từ thịt: Sự đào thải Cd ở thịt của nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 10,0 mg/L là nhiều nhất, tiếp theo là nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 5,0 và 3,0 mg/L. Hàm lượng đào thải Cd ra khỏi thịt là $0,41 \pm 0,06$ mg/kg đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 3,0 mg/L; $1,62 \pm 0,27$ mg/kg đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 5,0 mg/L và $2,27 \pm 0,22$ mg/kg đối với nhóm cá đã từng phơi nhiễm Cd 10,0 mg/L.

Quy luật đào thải của Cd ra khỏi các mô mang, gan và thịt của cá rô đồng đã từng sống phơi nhiễm sau 14 ngày sống trong nước sạch theo thứ tự như sau Gan >> Mang > Thịt.

Cd là kim loại độc hại không có chức năng sinh học. Sự tích tụ sinh học và khuếch đại của Cd dọc theo chuỗi và lưới thức ăn trong các hệ sinh thái gây ra rủi ro sức khỏe cho con người. Độ độc cấp tính của Cd đối với cá rô đồng là 38 mg/L. Cd ảnh hưởng lâu dài đến sự tăng trọng lượng và kích thước của cá rô đồng mặc dù cá phơi nhiễm Cd được sống trong nước sạch. Tích lũy Cd trong cá rô đồng tăng theo nồng độ Cd trong nước và thời gian phơi nhiễm Cd. Quy luật phân bố và tích lũy Cd trong cá rô đồng như sau: Gan >> Mang > Thịt. Căng thẳng độc hại của Cd là gây rối loạn nội tiết, suy giảm chức năng tuyến tụy và suy giảm chức năng gan trong cá rô đồng dẫn đến tăng lượng cortisol, giảm lượng insulin và phân giải glycogen dự trữ trong gan. Mặc dù, mức độ loại bỏ Cd ra khỏi mang, gan và thịt cá rô đồng đã từng phơi nhiễm Cd là có nhưng mức độ không đáng kể. Có thể thấy khi kim loại độc hại này tích tụ trong các mô của cá thì rất khó để loại bỏ hoàn toàn ra khỏi cơ thể.

3.4. SO SÁNH TÁC ĐỘNG ĐỘC HẠI CỦA Pb VÀ Cd ĐỐI VỚI CÁ RÔ ĐỒNG (*Anabas testudineus*)

Chì (Pb) và cadimi (Cd) đều là những kim loại độc hại có khả năng tích lũy sinh học trong cơ thể cá rô đồng, tuy nhiên mức độ và cơ chế tác động của chúng có những điểm khác biệt nhất định. Ở cả giai đoạn phơi nhiễm và thôi nhiễm, Pb và Cd đều có các tác động độc hại lên cá rô đồng, Bảng 3.7 trình bày kết quả thống kê và so sánh các biểu hiện độc tính của hai kim loại này đối với cá rô đồng trong cả hai giai đoạn nghiên cứu.

Bảng 3.7. So sánh tác động độc hại của Cd và Pb đối với cá rô đồng

Các tác động độc hại		Pb	Cd
Tác động độc cấp tính (LC ₅₀ 96 giờ)		120,0 mg/L	38,0 mg/L
Tác động độc tính bán trường diễn - Phơi nhiễm 28 ngày	<i>Sự phát triển</i>	Tiếp xúc lâu dài (28 ngày) với Pb (20 – 40 mg/L) và Cd (3 – 10 mg/L) ở nồng độ dưới ngưỡng gây chết đã làm cá rô đồng chậm phát triển. Kích thước và trọng lượng của cá rô đồng phơi nhiễm Pb và Cd tăng nhưng không đáng kể so với cá đối chứng.	
	<i>Sự tích lũy giống nhau</i>	Tích lũy Pb và Cd trong cá phơi nhiễm tăng theo thời gian và nồng độ Pb và Cd trong nước.	
	<i>Sự tích lũy khác nhau</i>	- Thứ tự phân bố và tích lũy Pb như sau: Mang >> Gan > Thịt. - Tích tụ Pb trên mang từ $97,57 \pm 2,33$ đến $471,84 \pm 3,92$ mg/kg mang khô. - Tích tụ Pb trong gan từ $18,00 \pm 1,65$ đến $174,45 \pm 5,55$ mg/kg gan khô. - Tích tụ Pb trong thịt từ $9,67 \pm 3,15$ đến $153,60 \pm 5,78$ mg/kg thịt khô.	- Thứ tự phân bố và tích lũy Cd như sau: Gan >> Mang > Thịt. - Tích tụ Cd trên mang từ $5,24 \pm 0,14$ đến $30,99 \pm 0,73$ mg/kg mang khô. - Tích tụ Cd trong gan từ $208,84 \pm 6,87$ đến $1586,10 \pm 8,07$ mg/kg gan khô. - Tích tụ Cd trong thịt từ $0,60 \pm 0,05$ đến $7,69 \pm 0,13$ mg/kg thịt khô.
	<i>Cortisol trong máu</i>	Tiếp xúc lâu dài với Pb và Cd đã làm gián đoạn đến hoạt động bình thường của trục hạ đồi – tuyến yên – liên thận (HPI), dẫn đến tình trạng sản xuất cortisol quá mức.	

Các tác động độc hại		Pb	Cd
	Rối loạn insulin trong máu	Tiếp xúc lâu dài với Pb và Cd đã làm suy yếu chức năng của các tế bào beta tuyến tụy, dẫn đến tình trạng dẫn đến giảm sản xuất insulin (thiếu hụt insulin).	
	Phân hủy glycogen gan	Tiếp xúc lâu dài với Pb và Cd đã làm suy yếu chức năng gan, cản trở quá trình tiêu hóa và phá vỡ các con đường trao đổi chất, dẫn đến phân giải glycogen dự trữ ở gan.	
Tác động độc tính bán trường diễn - Thôi nhiễm 14 ngày	Sự phát triển	Phơi nhiễm Pb và Cd kéo dài đã gây ra căng thẳng độc hại, ảnh hưởng mạnh đến khả năng hồi phục của cá rô đồng. Ngay cả khi được nuôi trong môi trường nước sạch sự tăng trưởng về trọng lượng và kích thước của nhóm cá này vẫn chậm hơn đáng kể so với nhóm đối chứng, điều này cho thấy tác động lâu dài của Pb và Cd lên cá.	
	Sự đào thải giống nhau	Có sự đào thải tương đối Pb và Cd ra khỏi mang và gan nhưng ít hơn ở thịt của cá rô đồng đã từng phơi nhiễm.	
	Sự đào thải khác nhau	- Thứ tự đào thải Pb như sau: Mang >> Gan > Thịt. - Đào thải Pb ra khỏi mang từ $89,99 \pm 5,77$ đến $292,19 \pm 6,40$ mg/kg mang khô. - Đào thải Pb ra khỏi gan từ $26,42 \pm 5,59$ đến $35,53 \pm 5,70$ mg/kg gan khô. - Đào thải Pb ra khỏi thịt từ $16,19 \pm 5,68$ đến $20,53 \pm 5,50$ mg/kg thịt khô.	- Thứ tự đào thải Cd như sau: Gan >> Mang > Thịt. - Đào thải Cd ra khỏi mang từ $7,63 \pm 0,42$ đến $8,95 \pm 0,56$ mg/kg mang khô. - Đào thải Cd ra khỏi gan từ $81,48 \pm 10,04$ đến $173,33 \pm 6,71$ mg/kg gan khô. - Đào thải Cd ra khỏi thịt từ $0,41 \pm 0,06$ đến $2,27 \pm 0,22$ mg/kg thịt khô.

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Trên cơ sở nghiên cứu mức độ tích lũy, đào thải cũng như tác động của Pb và Cd đến ba chỉ tiêu sinh hóa cortisol, insulin và glycogen của cá rô đồng (*Anabas testudineus*), luận án có những kết luận sau:

1. Độ độc cấp tính của Pb và Cd (LC_{50} 96 giờ) đối với cá rô đồng lần lượt là 120 và 38 mg/L.
2. Đã xác định được quy luật phân bố và tích lũy Pb và Cd đối với cá rô đồng. Trong đó, ở Pb quy luật này là Mang >> Gan > Thịt cá và ở Cd là Gan >> Mang > Thịt cá. Hàm lượng tích lũy Pb và Cd trong cá thí nghiệm tăng theo nồng độ Pb và Cd trong nước và thời gian phơi nhiễm.
3. Đã tìm thấy quy luật đào thải Pb và Cd đối với cá rô đồng. Trong đó, quy luật đào thải đối với cá đã từng phơi nhiễm Pb là Mang > Gan > Thịt và đối với cá đã từng phơi nhiễm Cd là Gan >> Mang > Thịt.
4. Căng thẳng độc hại của Pb và Cd đối với cá rô đồng là làm gián đoạn hoạt động bình thường của trục HPI dẫn đến tăng sản xuất cortisol, làm suy yếu chức năng tế bào beta tuyến tụy dẫn đến giảm sản xuất insulin và suy yếu chức năng gan dẫn đến phân giải glycogen dự trữ ở gan.
5. Căng thẳng độc hại của Pb và Cd đã làm cho cá rô đồng chậm phát triển trong giai đoạn phơi nhiễm (28 ngày) và chậm phục hồi trong giai đoạn thôi nhiễm (14 ngày).

4.2. KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu được có thể thấy kim loại nặng có tác động không nhỏ đến mức độ tích lũy và đào thải ở cá nói riêng và loài thủy sinh nói chung, điều này gây ảnh hưởng lớn đến chuỗi thức ăn của con người. Do đó luận án có những đề xuất sau:

- Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chuyển dạng của các kim loại nặng (Pb, Cd) trong các mô của cá rô đồng.
- Nghiên cứu ảnh hưởng hiệp đồng của Pb và Cd lên các mô trong cơ thể cá rô đồng và tác động lên chỉ tiêu sinh hóa của cá rô đồng.
- Điều tra mức độ tích lũy kim loại nặng trong cá rô đồng sống trong môi trường tự nhiên nhằm cảnh báo nguy cơ ô nhiễm kim loại nặng đến chuỗi thức ăn.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của quá trình đào thải kim loại nặng (như Pb, Cd, ...) đến hệ nội tiết của cá rô đồng và các loài thủy sản thường được người dân và ngành thủy sản quan tâm.

- Nghiên cứu sự tích lũy, đào thải của Pb và Cd đối với loài thủy sinh khác, đặc biệt là những loài thường có mặt trong chuỗi thức ăn hoặc các loài có giá trị thương phẩm cao và được ngành thủy sản quan tâm.

- Nghiên cứu thử nghiệm các chỉ tiêu sinh học (cortisol, insulin, glucagon, glucose, glycogen,...) ở một vài loài cá như một công cụ đánh giá và giám sát mức độ ô nhiễm môi trường.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Tạp chí SCIE

1. **Dang Nguyen Nha Khanh**, Ngo Thi Tuong Vy, Tran Ha Phuong, Pham Tuan Nhi, Nguyen Quoc Thang, Do Trung Sy, Nguyen Thi Kim Phuong, **“Effects of Cadmium and Lead on Muscle and Liver Glycogen Levels of Climbing Perch (*Anabas testudineus*)”**, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.108, pp. 854 – 860, 2022 (H-Index 90,Q2);

2. **D. N. Nha Khanh**, N. T. Tuong Vy, N. Quoc Thang, D. Trung Sy, B. Quang Minh, N. The Anh, D. V. Bao Tran, L. Khue Tu & N. T. Kim Phuong, **“Accumulation and response to stress in climbing perch (*Anabas testudineus*) on exposure to high concentrations of lead and cadmium in water”**, *The European Zoological Journal*, Vol. 89(1), pp. 877 – 887, 2022 (H-Index 47 – Q2).

Hội thảo trong nước

1. **Dang Nguyen Nha Khanh**, Ngo Thi Tuong Vy, Doan Thi Minh Phuong, Nguyen Quoc Thang, Nguyen Thi Kim Phuong, **“A rapid HPLC combined with UV method for the determination of blood insulin and the evaluation of the effect of Pb on insulin secretion in climbing perch (*Anabas testudineus*)”**, *Conference Proceedings of analytica Vietnam 2025*, session 2: Pharmaceutical analysis and Health science, pp. 363 – 371, 2025.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hulla J. E., Navarro L., 2014, *Toxicity, Subchronic and Chronic*, in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press; Oxford. 626–633.
2. Bá Lê Huy, 2008, *Độc học môi trường cơ bản*, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh,
3. *Độc tính bán trường diễn là gì? Các nghiên cứu khoa học*. Available from: <https://scholarhub.vn/topic/%C4%91%E1%BB%99c%20t%C3%ADnh%20b%C3%A1n%20tr%C6%B0%E1%BB%9Dng%20di%E1%BB%85n>.
4. Rebecca Fisher David R. Fox , Andrew P. Negri , Joost van Dam , Florita Flores , Darren Koppel, 2023, Methods for estimating no-effect toxicity concentrations in ecotoxicology, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 20, 279–293.
5. Michael A. Dorato Jeffery A. Engelhardt, 2005, The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: Use, issues, and definition(s), *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42, 265–274.
6. *Biomagnification and Bioaccumulation: Definition, Differences, Importance*. Available from: <https://www.careerpower.in/school/biology/difference-between-biomagnification-and-bioaccumulation>.
7. Fuchylo Ulyana, Alharbi Hattan A., 2022, Inflammation of Gill Epithelia in Fish Causes Increased Permeation of Petrogenic Polar Organic Chemicals via Disruption of Tight Junctions, *Environmental Science & Technology*, 56(3), 1820–1829.
8. David A. Wright Pamela Welbourn, 2002, *Environmental Toxicology*, Cambridge University Press,
9. Streit Bruno, 1998, *Bioaccumulation of contaminants in fish*, in *Fish Ecotoxicology*, Birkhäuser Basel; Basel. 353–387.
10. Tang Song, Luo Simin, 2024, Association between blood heavy metal exposure levels and risk of metabolic dysfunction associated fatty liver disease in adults: 2015–2020 NHANES large cross-sectional study, *Frontiers in Public Health*, Volume 12 - 2024.
11. Kumar V. Santhana, Sarkar Dhruba Jyoti, 2025, Utilizing microalgae biofilm for reducing arsenic toxicity on fish grown in contaminated waters: An innovative solution for safer and cleaner aquaculture in arsenic endemic areas, *Aquaculture*, 599, 742121.
12. Daniel Schlenk Malin Celander, Evan Gallagher, Stephen George, Margaret James, Seth Kullman, Peter van den Hurk, and Kristie Willett, 2008, *Biotransformation in Fishes*, Taylor & Francis Group, LLC.
13. Topić Popović Natalija, Čizmek Lara, 2023, Fish liver damage related to the wastewater treatment plant effluents, *Environmental Science and Pollution Research*, 30(17), 48739–48768.
14. Martinez C. B. R.; Nagae, M. Y.; Zaia, C. T. B. V.; Zaia, D. A. M, 2004, Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*, *Brazilian Journal of Biology*, 64, 797–807.

15. Jamil Emon F Rohani MF, Sumaiya N, Tuj Jannat MF, Akter Y, Shahjahan M, Abdul Kari Z, Tahiluddin AB, Goh KW, 2023, Bioaccumulation and Bioremediation of Heavy Metals in Fishes-A Review, *Toxics*, 11, 510.
16. Ray SuryapratapVashishth Rahul, 2024, From water to plate: Reviewing the bioaccumulation of heavy metals in fish and unraveling human health risks in the food chain, *Emerging Contaminants*, 10(4), 100358.
17. Ju-Wook Lee A-Hyun Jo, Yue-Jai Kang, Dain Lee, Cheol-Young Choi, Ju-Chan Kang, Jun-Hwan Kim, 2025, Review of Cadmium Bioaccumulation in Fish Exposed to Cadmium, *Toxics*, 13, 1–16.
18. Lee Ju-Wook, Choi Hoon, 2019, Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68, 101–108.
19. Hananeh Azar Mohammad Forouhar Vajargah, 2023, Investigating the effects of accumulation of lead and cadmium metals in fish and its impact on human health, *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 12, 209–213.
20. Zhong Bin, Wang Xiangqin, 2017, A mechanism underlies fish GRP78 protection against Pb²⁺ toxicity, *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 185–188.
21. Rice Clinton, Ghorai Jugal K., 2011, Developmental lead exposure causes startle response deficits in zebrafish, *Aquatic Toxicology*, 105(3), 600–608.
22. Kim Jun-HwanKang Ju-Chan, 2015, The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, 33–39.
23. Hwang In-Ki, Kim Kyeong-Wook, 2016, Toxic effects and depuration after the dietary lead(II) exposure on the bioaccumulation and hematological parameters in starry flounder (*Platichthys stellatus*), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 328–333.
24. Kim Jun-HwanKang Ju-Chan, 2014, The selenium accumulation and its effect on growth, and haematological parameters in red sea bream, *Pagrus major*, exposed to waterborne selenium, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 96–102.
25. Khan Zaman, Elahi Amina, 2022, Cadmium sources, toxicity, resistance and removal by microorganisms-A potential strategy for cadmium eradication, *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(6), 101569.
26. Zahran Eman, Mamdouh Al-Zahraa, 2025, The impact of heavy metal pollution: bioaccumulation, oxidative stress, and histopathological alterations in fish across diverse habitats, *Aquaculture International*, 33(5), 371.
27. Chang Xulu, Chen Yongyan, 2021, Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and immune damage by probiotic *Bacillus coagulans* in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture Reports*, 20, 100678.
28. Lee Deok-Chan, Choi Young Jae, 2022, Toxic effects of waterborne cadmium exposure on hematological parameters, oxidative stress, neurotoxicity, and heat

- shock protein 70 in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 476–483.
29. Nordberg MonicaNordberg Gunnar F. *Metallothionein and Cadmium Toxicology—Historical Review and Commentary*. *Biomolecules*, 2022. **12**, DOI: 10.3390/biom12030360.
 30. Kalamarz-Kubiak Hanna, 2017, *Cortisol in Correlation to Other Indicators of Fish Welfare, in Corticosteroids*, IntechOpen; Rijeka.
 31. Boulton Kay, *Coping with stress: personality, life history and social dominance in swordtail fishes, Xiphophorus sp.* 2014.
 32. Wilcox G., 2005, Insulin and insulin resistance, *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19–39.
 33. Jiaojiao Yu, Sun Caifeng, 2018, Applying emerging technologies to improve diabetes treatment, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1225–1236.
 34. Liang Wang Qinghua Liua, Mengmeng Wang, Yan Du, Xinle Tan, Bingju Xu, Ut Cheung, Enpeng Li, Robert G. Gilbert, Daoquan Tang, 2020, Effects of fasting on liver glycogen structure in rats with type 2 diabetes, *Carbohydrate Polymers*, 237, 116144.
 35. *Glycogen*. 2019; Available from: <https://biologydictionary.net/glycogen/>.
 36. Khan Manon Md Rased, Alam Asraful, 2023, Intraspecific phenotypic differences in climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) populations may be linked to habitat adaptations, *Heliyon*, 9(7), e17685.
 37. Ánh Nguyễn. *Cá rô đồng - Tìm hiểu về loài cá đồng quê trứ danh*. 2025; Available from: <https://dongvat.edu.vn/ca-ro-dong>.
 38. Nguyễn Văn Khánh Trần Duy Vinh, Lê Hà Yến Nhi, 2014, Hàm lượng kim loại nặng (Hg, Cd, Pb, Cr) trong các loài động vật hai mảnh vỏ ở một số cửa sông tại khu vực miền Trung, Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 14, 385–391.
 39. Phạm Kim Đăng Bùi Thị Bích, Vũ Đức Lợi, 2015, Sự tích lũy một số kim loại trong cá chép (*Cyprinus carpio*) nuôi tại trại nuôi trồng thủy sản, Học viện nông nghiệp Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13, 394–405.
 40. 2020, Khảo sát ô nhiễm kim loại nặng trong các loài ngao và hào nuôi tại Vân Đồn - Quảng Ninh, miền Bắc Việt Nam, *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học* 25.
 41. Vo T. V., Tran, Y. T., & Hoang, A. V., 2020, Assessment of heavy metals content and consumer health risk to *Siganus fuscescens* (Houttuyn, 1782) from Quang Binh province, *The Journal of Agriculture and Development*, 19, 46–54.
 42. Đỗ Thị Hiền Lê Bảo Linh, Trịnh Thị Thủy, Trịnh Thị Thắm, 2024, Đánh giá mức độ tích lũy một số kim loại nặng trong trầm tích mặt tại một số cửa sông ven biển tỉnh Thái Bình, *Tạp chí Môi trường*, IV/2024, 37–34.
 43. Đàm Minh Anh Phạm Thị Phương, Trần Ngọc Sơn, Trịnh Đăng Mậu, Nguyễn Khắc Hưng, 2024, Nghiên cứu hiện trạng kim loại nặng tại một số cửa sông thuộc tỉnh Quảng Nam và TP. Đà Nẵng, *Tạp chí Môi trường*, 3/2024, 7–10.

44. Tariang Kermi-u, Ramanujam Sunkam N., 2019, Effect of arsenic (As) and lead (Pb) on glycogen content and on the activities of selected enzymes involved in carbohydrate metabolism in freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, *International Aquatic Research*, 11(3), 253–266.
45. Gopi Narayanan, Vijayakumar Sekar, 2019, Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: Effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune responses, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 55, 170–179.
46. Botwe Benjamin O., 2021, Heavy metal concentrations in five fish species from the Gulf of Guinea and their human health implications, *Regional Studies in Marine Science*, 44, 101763.
47. Ullah Sana, Li Zhongqiu, 2021, Heavy metals bioaccumulation and subsequent multiple biomarkers based appraisal of toxicity in the critically endangered *Tor putitora*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 113032.
48. Sonia Aslam Ali Muhammad Yousafzai & Aleena Javed, 2022, Bioaccumulation of Hexavalent Chromium in Commercially Edible Fish Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*, *Sains Malaysiana*, 51, 2757–2762.
49. Zhang Jianlu, Zhu Mingzhen *The Combined Use of Copper Sulfate and Trichlorfon Exerts Stronger Toxicity on the Liver of Zebrafish*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**, DOI: 10.3390/ijms241311203.
50. Habib Syed Sikandar, Maqaddas Sawera, 2024, Evaluation of lead exposure effects on tissue accumulation, behavior, morphological and hemato-biochemical changes in common carp, *Cyprinus carpio*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 86, 127523.
51. Yuichi Iwasaki Tomoko Oguri, Kazutoshi Ueda, Kentaro Morita, 2025, Significant metal accumulation in fish in a metal-contaminated river without detectable effects on fish and macroinvertebrate communities, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 44, 1228–1234.
52. J. G. Nickum Chair, H. L. Bart, Jr, P. R. Bowser, I. E. Greer, C. Hubbs, J. A. Jenkins, J. R. MacMillan, J. W. Rachlin, J. D. Rose, P. W. Sorensen, and J. R. Tomasso, *Guidelines for the Use of Fishes in Research*, A.I.o.F.R.B. American Fisheries Society, American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Editor. 2004.
53. Long Dương Nhứt, 2003, *Giáo trình Kỹ thuật nuôi thủy sản nước ngọt*, NXB Đại học Cần Thơ,
54. Nguyen Quoc Thang Bui The Huy, Le Van Tan, Nguyen Thi Kim Phuong, 2017, Lead and Arsenic Accumulation and Its Effects on Plasma Cortisol Levels in *Oreochromis* sp, *Bull Environ Contam Toxicol*, 99, 187–193.
55. Babiker A. Elamin Abdulmajeed Al-Maleki, Mohammad A. Ismael, Mohammed Akli Ayoub, 2014, Purification and functional characterization of pancreatic insulin from camel (*Camelus dromedarius*), *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 574–581.

56. Krisman Clara R., 1962, A method for the colorimetric estimation of glycogen with Iodine, *Analytical Biochemistry*, 4, 17–23.
57. Gupta V.B., Shrivastava, A., 2011, Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods, *Chronicles of Young Scientist*, 2, 21–25.
58. Eduardo Kinio Sugawara Luciane Maria Ribeiro Neto, Ieda Terezinha do Nascimento Verreschi, 2010, Determination of free urinary cortosol on cushing's syndrome using reversed-phase high peformance liquid chromatography *Química Nova*, 33, 447–450.
59. Caldarell A. M., , E. George, Reardon and Ernesto Canalis, 1982, Analysis for Cortisol in Serum by Liquid Chromatography, *Clinical Chemistry*, 28(3), 538–543.
60. Sugawara E. K., L. M. R. Neto e Ieda Terezinha do Nascimento Verreschi, 2010, Determination of free urinary cortisol in cushing's syndrome using reversed-phase high performance liquid chromatography, *Química Nova*, 32(2), 447–450.
61. Taylor R.L., D. Machacek, R. J. Singh, 2002, Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone, *Clinical Chemistry*, 48, 1511–1519.
62. Furuta T., C. Mori, A. Suzuki, H. Shibasaki, A. Yokokawa, Y. Kasuya, 2004, Simultaneous determination of 6- beta-hydroxycortisol and cortisol in human urine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for phenotyping the CYP3A activity determined by the cortisol 6-beta-hydroxylation clearance, *Journal Chromatography B*, 801(2), 165–171.
63. Hu Z., Q. Gong, X. Hu, L. Wang, Y. Cao, W. Cao, Q. Yu, Z. Cheng, 2005, Simultaneous determination of 6-beta-hydroxycortisol and cortisol in human urine and plasma by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for phenotyping the CYP3A activity, *Journal Chromatography B*, 826(1), 238–243.
64. Zhang Y., H. L. Wu, Y. J. Ding, A. L. Xia, H. Cui, R. Q. Yu, 2006, Simultaneous determination of cortisol and prednisolone in body fluids by using HPLC-DAD coupled with second-order calibration based on alternating trilinear decomposition, *Journal Chromatography B*, 840(2), 116–123.
65. Nassar A. E., N. Varshney, T. Getek, L. Cheng, 2001, Quantitative analysis of hydrocortisone in human urine using a high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric-atmospheric-pressure chemical ionization method, *Journal Chromatography, Science*, 39, 59–64.
66. Emami Jaber, Haghighi, Maryam, Rostami, Mahboobeh, Minaiyan, Mohsen, 2022, Development and validation of a new robust RP-HPLC method for simultaneous quantitation of insulin and pramlintide in non-invasive and smart glucose-responsive microparticles, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 17, 594–611.

67. Moslemi Payam, Najafabadi Abdolhossein Rouholamini, 2003, A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(1), 45–51.
68. Najjar Ahmad, Alawi Mahmoud, 2014, A Rapid, Isocratic HPLC Method for Determination of Insulin and Its Degradation Product, *Advances in Pharmaceutics*, 2014(1), 749823.
69. L.W. Bennett R.W. Keirs, E.D. Peebles, P.D. Gerard 2007, Methodologies of Tissue Preservation and Analysis of the Glycogen Content of the Broiler Chick Liver, *Poultry Science*, 86, 2653–2665.
70. Hak-Jae Kim Shahid Mahboob, Ponnuswamy Viayaraghavan, Khalid Abdullah Al-Ghanim, Fahad Al-Misned Young Ock Kim, Zubair Ahmed, 2020, Determination of toxic effects of lead acetate on different sizes of zebra fish (*Danio rerio*) in soft and hard water, *Journal of King Saud University – Science*, 1390–1394.
71. Min-Jung Kim Kyung Mi Lee, Sung-Pyo Hur, Cheol Young Choi, Jun-Hwan Kim, 2025, Toxic Effects of Waterborne Pb Exposure on Hematological Parameters and Plasma Components in Starry Flounder, *Platichthys stellatus*, *Animals*, 15, 932.
72. Vardi Venkateswarlu Chenji Venkatrayulu, 2020, Bioaccumulation of heavy metal lead (Pb) in different tissues of brackish water fish *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 8, 1–5.
73. Saili Paul Anuradha Mandal, Piyasi Bhattacharjee, Shatarupa Chakraborty, Rituparna Paul, Biplab Kumar Mukhopadhyay, 2019, Evaluation of water quality and toxicity after exposure of lead nitrate in fresh water fish, major source of water pollution, *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 45, 345–351.
74. Thăng Nguyễn Quốc, *Nghiên cứu quá trình tích lũy và đào thải kim loại nặng (As, Cd, Pb) và khả năng ảnh hưởng của chúng đến hàm lượng cortisol trong cá điêu hồng (Oreochromis sp.)*, in *Hóa học*. 2017, Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
75. Hesni Majid Askari, Dadolahi-Sohrab Ali. *Study the Acute Toxicity of Lead Nitrate Metal Salt on Behavioral Changes of the Milkfish (Chanos chanos)*. 2011.
76. Saha N.C.; Chatterjee, A.; Banerjee, P.; Bhattacharya, R.; Sadhu, A.; Pastorino, P.; Saha, S, 2024, Toxic Effects of Lead Exposure on Freshwater Climbing Perch, *Anabas testudineus*, and Bioremediation Using *Ocimum sanctum* Leaf Powder, *Toxics*, 12, 927.
77. Lei Zhao Ya-Guang Zheng, Yong-Hui Feng, Mu-Yang Li, Gui-Qin Wang, Yan-Fen Ma, 2020, Toxic effects of waterborne lead (Pb) on bioaccumulation, serum biochemistry, oxidative stress and heat shock protein-related genes expression in *Channa argus*, *Chemosphere*, 261, 127714.

78. McDonald Scott D. Reid and D. G., 1991, Metal Binding Activity of the Gills of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1061–1068.
79. Tanhan Phanwimol, Kanjana Imsilp, 2023, Oxidative response to Cd and Pb accumulation in coastal fishes of Pattani Bay, *Italian Journal of Animal Science*, 22(1), 148–156.
80. Sivakumar Rajeshkumar Xiaoyu Li, 2018, Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China, *Toxicology Reports*, 5, 288–295.
81. Mustafa Canli Gülüzar Atli, 2003, The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species, *Environmental Pollution*, 121, 129–136.
82. Kh. M. El-Moselhy A.I. Othman, H. Abd El-Azem, M.E.A. El-Metwally 2014, Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1, 97–105.
83. Katarina Jovičić Dragica M. Nikolić, Željka Višnjić-Jeftić, Vesna Đikanović, Stefan Skorić, Srđan M. Stefanović, Mirjana Lenhardt, Aleksandar Hegediš, Jasmina Krpo-Četković & Ivan Jarić, 2015, Mapping differential elemental accumulation in fish tissues: assessment of metal and trace element concentrations in wels catfish (*Silurus glanis*) from the Danube River by ICP-MS, *Environmental Science and Pollution Research* 22, 3820–3827.
84. Shinn C., Dauba F., 2009, Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river lot in southern France, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1957–1965.
85. Ana Rosa Linde Dominik Klein, Karl Heinz Summer, 2005, Phenomenon of Hepatic Overload of Copper in *Mugil cephalus*: Role of Metallothionein and Patterns of Copper Cellular Distribution, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 97, 230–235.
86. Ivan Jarić Željka Višnjić-Jeftić, Gorčin Cvijanović, Zoran Gačić, Ljubinko Jovanović, Stefan Skorić, Mirjana Lenhardt 2011, Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES, *Microchemical Journal*, 98, 77–81.
87. Ghada Y. Zaghloul Hoda A. Eissa, Amira Y. Zaghloul, Mahmoud S. Kelany, Mohamed A. Hamed, Khalid M. El Moselhy, 2024, Impact of some heavy metal accumulation in different organs on fish quality from Bardawil Lake and human health risks assessment, *Geochemical Transactions*, 25.
88. PJ Kotze, *Aspects of water quality, metal contamination of sediment and fish in the Oilfants River, Mpumalanga*. 1997, Rand African University South Africa.
89. Kah Hin Low Sharifuddin Md. Zain & Mhd. Radzi Abas 2011, Evaluation of Metal Concentrations in Red Tilapia (*Oreochromis spp*) from Three Sampling Sites in Jebebu, Malaysia Using Principal Component Analysis, *Food Analytical Methods*, 4, 276–285.

90. Allen Paul, 1993, Accumulation profiles of lead and the influence of Cadmium and Mercury in *Oreochromis aureus* (Steindachner) during Chronic exposure, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 44, 101–112.
91. S. J. Tulasi P. U. M. Reddy, J. V. Ramanarao, 1992, Accumulation of Lead and Effects on Total Lipids and Lipid Derivatives in the Freshwater Fish *Anabas testudineus* Bloch), *Ecotoxicology and Environmental safety*, 23, 33–38.
92. Wong C. K., Wong P. P. K., 2001, Heavy Metal Concentrations in Marine Fishes Collected from Fish Culture Sites in Hong Kong, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(1), 60–69.
93. Altındağ A.Yiğit S., 2005, Assessment of heavy metal concentrations in the food web of lake Beyşehir, Turkey, *Chemosphere*, 60(4), 552–556.
94. Karadede-Akin H.Unlü E., 2007, Heavy metal concentrations in water, sediment, fish and some benthic organisms from tigris river, Turkey, *Environmental monitoring and assessment*, 131(1-3), 323–337.
95. Evans David H., Piermarini Peter M., 2005, The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste, *Physiological Reviews*, 85(1), 97–177.
96. Sumi N., Chitra, K.C, 2019, Impact of fullerene C60 on behavioral and hematological changes in the freshwater fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792), *Applied Nanoscience*, 9, 2147–2167.
97. Nayak S., Patnaik, L, 2023, Histopathological and Biochemical Changes in the Gills of *Anabas testudineus* on Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Naphthalene, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195, 2414–2431.
98. Patnaik L., Nayak, S, 2025, Histological Alterations in Liver of *Anabas testudineus* on Short Term Exposure to Naphthalene, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 114, 91.
99. Ganesh C.B., 2021, The stress – Reproductive axis in fish: The involvement of functional neuroanatomical systems in the brain, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 112, 101904.
100. James N. Fryer & Lederis, K, 1986, Control of Corticotropin Secretion in Teleost Fishes, *American Zoologist*, 26, 1017–1026.
101. Mommsen T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W, 1999, Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211–268.
102. T G Pottinger E Mosuwe, 1994, The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a "critical period", *General and Comparative Endocrinology*, 95, 350–362.
103. A. Hontela, 1997, Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones, *Reviews in Toxicology*, 1, 1–46.
104. Neelakanteswar Aluru Even H Jorgensen, Alec G Maule, Mathilakath M Vijayan, 2004, PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor downregulation in anadromous Arctic

- charr, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287, 787–793.
105. Bonga S E Wendelaar, 1997, The stress response in fish, *Physiological reviews*, 77, 591–625.
 106. Alice Hontela Joseph B. Rasmussen, Céline Audet & Gaston Chevalier, 1992, Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 278–283.
 107. Pottinger Tom G., 2017, Modulation of the stress response in wild fish is associated with variation in dissolved nitrate and nitrite, *Environmental Pollution*, 225, 550–558.
 108. Julie R. Marentette Stephanie Tong, Sigal Balshine, 2012, The cortisol stress response in male round goby (*Neogobius melanostomus*): effects of living in polluted environments?, *Environmental Biology of Fishes* 96, 723–733.
 109. Carol Jones Christopher Gwenin, 2020, Cortisol level dysregulation and its prevalence - Is it nature's alarm clock, *Physiological Reports*, 8, 14644.
 110. Leila Soledade Lemos Leo Moreira Angarica, Rachel Ann Hauser-Davis, Natalia Quinete, 2023, Cortisol as a Stress Indicator in Fish: Sampling Methods, Analytical Techniques, and Organic Pollutant Exposure Assessments, 20, 6237.
 111. Shen Yixiao, Prinyawiwatkul Witoon, 2019, Insulin: a review of analytical methods, *Analyst*, 144(14), 4139–4148.
 112. Diana Putri Renitasari Andi Kurniawan, Ardana Kurniaji, 2021, Blood glucose of tilapia fish *Oreochromis mossambica* as a water bioindicator in the downstream of Brantas Waters, East Java *AACL Bioflux*, 14, 2040–2049.
 113. Porte D Jr Robertson RP, 1973, Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system, *Federation Proceedings*, 32, 1792–1796.
 114. R. James K. Sampath, S. Alagurathnam, 1996, Effects of Lead on Respiratory Enzyme Activity, Glycogen and Blood Sugar Levels of the Teleost *Oreochromis mossambicus* (Peters) during Accumulation and Depuration, *Asian Fisheries Science*, 9, 87–100.
 115. Maruthi Y.Rao M. V., 2000, Effect of distillery effluent on biochemical parameters of fish, *Channa punctatus* (Bloch), *Environmental Pollution*, 7, 111–113.
 116. Ricard A. C., Daniel C., 1998, Effects of Subchronic Exposure to Cadmium Chloride on Endocrine and Metabolic Functions in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(4), 377–381.
 117. Srivastava R.Srivastava N., 2008, Changes in nutritive value of fish, *Channa punctatus* after chronic exposure to zinc, *Journal of environmental biology*, 29(3), 299–302.
 118. James R., Sampath K., 1996, Effects of Lead on Respiratory Enzyme Activity, Glycogen and Blood Sugar Levels of the Teleost *Oreochromis mossambicus*

- (Peters) during Accumulation and Depuration, *Asian fisheries science*, 9, 87–100.
119. Aruljothi B. Sivanandan M. and Sankar Samipillai S., 1996, Effect of arsenic on protein and carbohydrate metabolism of fresh water fish, *labeo rohita*, *International Journal of Current Research*, 95(5), 1332–1335.
 120. Galina I. Izvekova Evgeny I. Izvekov, 2013, *Muscle and Liver glycogen in helminth-infected fish*, in *Glycogen: Structure, Functions in the Body and Role in Disease*, Nova Science Publishers, Inc. 81–108.
 121. Dai Yafan, Shen Yubang, 2024, Glycolysis and gluconeogenesis are involved of glucose metabolism adaptation during fasting and re-feeding in black carp (*Mylopharyngodon piceus*), *Aquaculture and Fisheries*, 9(2), 226–233.
 122. Bediicicik Kenan Engin, 2005, The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758), *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29, 113–117.
 123. Tewari S Bajpai S, Tripathi M, 2019, Effect of cadmium on glycogen content in muscle, liver, gill and kidney tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch), *Journal of Applied and Natural Science*, 11, 575–580.
 124. Karataş Tayfun, 2018, Effect of Short-Term Starvation on Serum Metabolites, Antioxidant Enzymes and Endogenous Reserves of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Pakistan Journal of Zoology*, 50, 1723–1729.
 125. Kalay M., Canli, M, 2000, Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*, *Turkish Journal of Zoology* 24, 429–436.
 126. F. Kargin H. Y. Çoğun, 1999, Metal Interactions During Accumulation and Elimination of Zinc and Cadmium in Tissues of the Freshwater Fish *Tilapia nilotica*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 511–519.
 127. Sadam Hussain Junejo Jameel Ahmed Baig, Tasneem Gul Kazi, Hassan Imran Afridi, 2019, Cadmium and Lead Hazardous Impact Assessment of Pond Fish Species, *Biological Trace Element Research*, 191, 502–511.
 128. Mani Ramalingam, Meena Boominathan. *Determination of LC50 of Cadmium Chloride in marine Catfish Arius*. 2013.
 129. Asim Ullah Hameed Ur Rehman, Waqar Saeed, Muhammad Faheem Quraish, Zakir Ullah, Haroon, Riaz Ur Rehman, Sajid Awais, Raqeebullah, Waqar Ahmad and Kausar Saeed, 2016, Determination of 96-hr LC50 value of cadmium for a fish, *Labeo rohita*, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4, 380–382.
 130. Saikat Roy Debasish Karmakar, Sarmila Pal, 2022, Acute Toxicity Bioassay and Determination of LC₅₀ of Cadmium Chloride in *Trichogaster (Colisa) fasciata*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194, 3890–3900.
 131. Md Golam Ambiya Sumit Nath, Salma Haque, Kausik Mondal, 2024, Studies on the Effect of Cadmium Chloride on the Behavioral and Histopathological

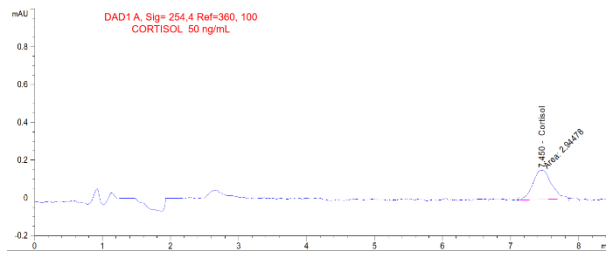
- Changes in *Cyprinus carpio* : A Short-Term Bioassay, *Environment and Ecology*, 42, 790–800.
132. Rangsayatorn N., Kruatrachue M., 2004, Ultrastructural changes in various organs of the fish *Puntius gonionotus* fed cadmium-enriched cyanobacteria, *Environmental Toxicology*, 19(6), 585–593.
 133. B. Baldisserotto M.J. Chowdhury, Chris M. Wood, 2005, Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout, *Aquatic Toxicology*, 72, 99–117.
 134. Seong-Gil Kim Jung-Hoon Jee, Ju-Chan Kang, 2004, Cadmium accumulation and elimination in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after sub-chronic cadmium exposure, *Environmental Pollution*, 127, 117–123.
 135. Kargın F.Çoğun H. Y., 1999, Metal Interactions During Accumulation and Elimination of Zinc and Cadmium in Tissues of the Freshwater Fish *Tilapia nilotica*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(4), 511–519.
 136. Dural Meltem, Göksu M. Ziya Lugal, 2007, Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon, *Food Chemistry*, 102(1), 415–421.
 137. A. A. Bawuro R. B. Voegborlo, A. A. Adimado, 2018, Bioaccumulation of Heavy Metals in Some Tissues of Fish in Lake Geriyo, Adamawa State, Nigeria, *Environmental and Public Health*, 2018, 1854892.
 138. Rangsayatorn N., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Upatham, E.S., Lanza, G.R. and Singhakaew, S, 2004, Ultrastructural changes in various organs of the fish *Puntius gonionotus* fed cadmium-enriched cyanobacteria, *Environ. Toxicol.*, 19, 585–593.
 139. Rahman Z., Ahmad, I. and Rashid, I., 2018, Effects of Cadmium Exposure on Growth and Survival and Accumulation in Various Organs of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus), *Journal of Agriculture and Aquaculture*, 1.
 140. Linde A. R., Klein D., 2005, Phenomenon of hepatic overload of copper in *Mugil cephalus*: role of metallothionein and patterns of copper cellular distribution, *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97(4), 230–235.
 141. Jarić Ivan, Visnjic Zeljka, 2011, Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES, *Microchemical Journal*, 98, 77–81.
 142. Amiard J. C., Amiard-Triquet C., 2006, Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers, *Aquatic toxicology*, 76(2), 160–202.
 143. Canli MustafaAtli Gülüzar, 2003, The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species, *Environmental Pollution*, 121(1), 129–136.

144. El-Moselhy Khalid, Othman Azza, 2014, Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1.
145. Jovičić K., Nikolić D. M., 2015, Mapping differential elemental accumulation in fish tissues: assessment of metal and trace element concentrations in wels catfish (*Silurus glanis*) from the Danube River by ICP-MS, *Environmental science and pollution research international*, 22(5), 3820–3827.
146. Agah H., Leermakers M., 2009, Accumulation of trace metals in the muscle and liver tissues of five fish species from the Persian Gulf, *Environmental monitoring and assessment*, 157(1-4), 499–514.
147. Randall D.J. Brauner C.J., Thurston R.V., Neuman J.F., 1996, Water chemistry at the gill surfaces of fish and the uptake of xenobiotics. *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Molecular and Cellular Approaches*, Cambridge University Press, 1–16.
148. Claiborne J. B., Edwards S. L., 2002, Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms, *The Journal of experimental zoology*, 293(3), 302–319.
149. Burcu Yesilbudak Cahit Erdem, 2014, Cadmium Accumulation in Gill, Liver, Kidney and Muscle Tissues of Common Carp, *Cyprinus carpio*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92, 546–550.
150. Jian Li Yulian Yan, Xiaojun Xie, 2018, Tissue-Specific Antioxidative Responses and Cadmium Accumulation in *Silurus meridionalis* Under Chronic Waterborne Cadmium Exposure, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100, 485–491.
151. Wei Luo Yibo Zhang, Shoudong Zhang, Kunpu Sun, Ke Li, Feifei He, Jixian Huang, Shiyong Yang, Zongjun Du, 2024, Cadmium accumulation characteristics and dietary risks in three aquatic animals with different habitat characteristics in a rice-fish co-culture system, *Aquaculture Reports*, 39, 102417.
152. Frank Thévenod Wing-Kee Lee, *Toxicology of Cadmium and Its Damage to Mammalian Organs*, Springer Dordrecht Heidelberg New York London.
153. T.N.D. Pham J.A. Ségui, C. Fortin, P.G.C. Campbell, F. Denizeau, C. Jumarie, 2004, Cadmium Uptake in Rat Hepatocytes in Relation to Speciation and to Complexation With Metallothionein and Albumin, *Journal of Cellular Physiology*, 201, 320–330.
154. Yinai Liu Qianqian Chen, Yaoqi Li, Liuliu Bi, Libo Jin, Renyi Peng, 2022, Toxic Effects of Cadmium on Fish, *Toxics*, 10, 622.
155. A.J. Dangre S. Manning, M. Brouwer, 2010, Effects of cadmium on hypoxia-induced expression of hemoglobin and erythropoietin in larval sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*, *Aquatic Toxicology*, 99, 168–175.

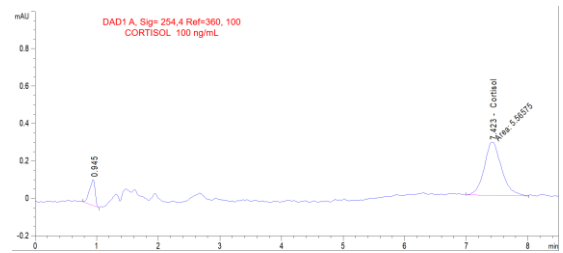
156. Gill T. S., Leitner G., 1993, Response of plasma cortisol to environmental cadmium in the eel, *Anguilla rostrata* LeSueur, *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 104(3), 489–495.
157. Pelgrom S., Lock R., 1995, Effects of combined waterborne Cd and Cu exposures on ionic composition and plasma cortisol in tilapia, *Oreochromis mossambicus*, *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology Endocrinology*, 111, 227–235.
158. A. C. Ricard C. Daniel, P. Anderson & A. Hontela 1998, Effects of Subchronic Exposure to Cadmium Chloride on Endocrine and Metabolic Functions in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 377–381.
159. Nguyen Quoc Thang Nguyen Thi Kim Phuong, Le Van Tan, 2017, Endocrine stress response in *Oreochromis* sp. from exposure to waterborne cadmium: the plasma cortisol analysis, *Toxicological & Environmental Chemistry* 99, 285–293.
160. Aldoghachi Mohammed A. Jasim, 2022, Effect of water-borne cadmium toxicity on some biochemical parameters and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio*, *Iranian Journal of Ichthyology*, 9, 205–210.
161. Z.C. Dang M.H.G. Berntssen, A.K. Lundebye, G. Flik, S.E. Wendelaar Bonga, R.A.C. Lock, 2001, Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium, *Aquatic Toxicology*, 53, 91–101.
162. Hiller-Sturmhöfel S.Bartke A., 1998, The endocrine system: an overview, *Alcohol health and research world*, 22(3), 153–164.
163. Macirella R., Guardia A., 2016, Effects of Two Sublethal Concentrations of Mercury Chloride on the Morphology and Metallothionein Activity in the Liver of Zebrafish (*Danio rerio*), *International journal of molecular sciences*, 17(3), 361.
164. Yu-Siang Lin Shu-Chuan Tsai, Hui-Chen Lin, Chung-Der Hsiao, Su Mei Wu, 2011, Changes of glycogen metabolism in the gills and hepatic tissue of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during short-term Cd exposure, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154, 296–304.
165. Jensen R., Nielsen J., 2020, Inhibition of glycogenolysis prolongs action potential repriming period and impairs muscle function in rat skeletal muscle, *Journal of physiology*, 598(4), 789–803.

PHỤ LỤC

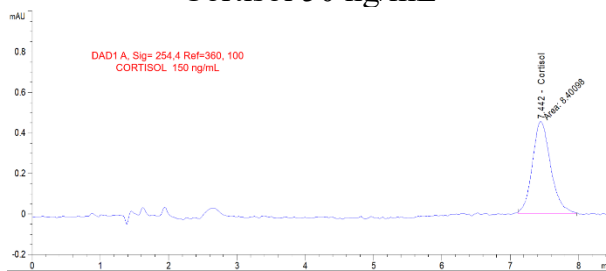
Phụ lục 1. Sắc ký đồ các mẫu cortisol chuẩn từ 50ng/mL đến 250ng/mL



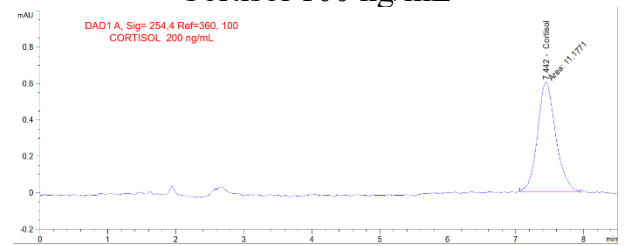
Cortisol 50 ng/mL



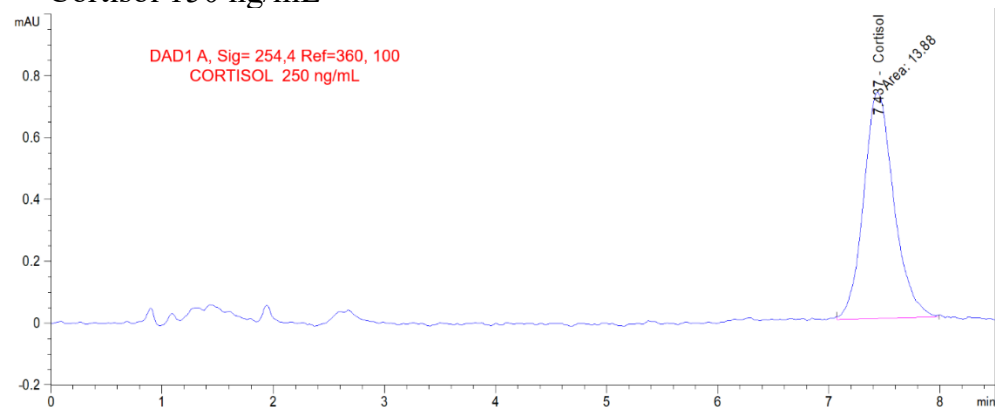
Cortisol 100 ng/mL



Cortisol 150 ng/mL



Cortisol 200 ng/mL



Cortisol 250 ng/mL

Phụ lục 2. Thông số xác định phương trình hồi quy của cortisol

		Value	Standard Error
B	Intercept	0.05246	0.03983
	Slope	0.05547	2.63108E-4

Statistics

	B
Number of Points	6
Degrees of Freedom	4
Residual Sum of Squares	0.01211
Pearson's r	0.99996
Adj. R-Square	0.99989

Summary

	Intercept		Slope		Statistics
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Adj. R-Square
B	0.05246	0.03983	0.05547	2.63108E-4	0.99989

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Model	1	134.63193	134.63193	44453.0573	3.03587E-9
	Error	4	0.01211	0.00303		
	Total	5	134.64405			

Phụ lục 3. Khảo sát sai số của đường chuẩn cortisol

<i>Nồng độ (ng/mL)</i>	<i>Chuẩn</i>	<i>Diện tích đỉnh</i>	<i>Diện tích trung bình ($\bar{X}$)</i>	<i>Độ lệch chuẩn (SD)</i>	<i>RSD (%)</i>
50	Chuẩn 1	2,891	2,926	0,030	1,03
	Chuẩn 2	2,942			
	Chuẩn 3	2,944			
100	Chuẩn 1	5,591	5,605	0,032	0,57
	Chuẩn 2	5,582			
	Chuẩn 3	5,641			
150	Chuẩn 1	8,323	8,332	0,055	0,66
	Chuẩn 2	8,391			
	Chuẩn 3	8,282			
200	Chuẩn 1	11,151	11,179	0,075	0,67
	Chuẩn 2	11,123			
	Chuẩn 3	11,264			
250	Chuẩn 1	13,941	13,855	0,085	0,61
	Chuẩn 2	13,852			
	Chuẩn 3	13,771			

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^3 \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó $n = 3$ là số lần phân tích lặp lại

Độ lệch chuẩn tương đối: $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 4. Kết quả độ lặp lại và độ tái lặp của cortisol

Nồng độ chuẩn (ng/mL)	Số lần đo	S (mAU)	
		Phân tích trong ngày	Phân tích giữa các ngày
50,0	1	2,81725	2,75940
	2	2,77097	2,71312
	3	2,73626	2,67841
	4	2,84039	2,63213
	5	2,80568	2,68998
	6	2,72469	2,74204
	Trung bình	2,78254	2,70251
	SD	0,04628	0,04605
	RSD (%)	1,66	1,70
98,8	1	5,19958	5,28190
	2	5,25592	5,18171
	3	5,32352	5,25963
	4	5,28972	5,31529
	5	5,30098	5,22067
	6	5,22493	5,17615
	Trung bình	5,26577	5,23923
	SD	0,04753	0,05595
	RSD (%)	0,90	1,07

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó n = 6 là số lần phân tích lặp lại.

Độ lệch chuẩn tương đối $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 5. Số liệu về độ chụm và độ đúng (n = 6) trong phân tích cortisol

Thông số	Nồng độ cortisol			
	Chuẩn 50,0 ng/mL		Chuẩn 98,8 ng/mL	
	Đo trong ngày	Đo giữa các ngày	Đo trong ngày	Đo giữa các ngày
1	49,84	48,80	92,79	94,28
2	49,01	47,97	93,81	92,47
3	48,38	47,34	95,03	93,87
4	50,26	46,51	94,42	94,88
5	49,63	47,55	94,62	93,17
6	48,17	48,49	93,25	92,37
Trung bình	49,22	47,77	93,98	93,51
SD	0,83	0,83	0,86	1,01
RSD (%) của độ chụm	1,70	1,74	0,91	1,08
Độ đúng (%)	98,43	95,55	95,13	94,64

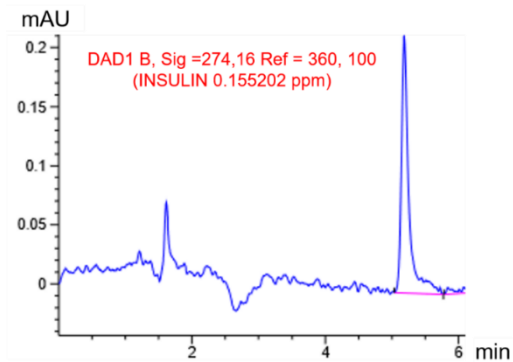
Với $SD^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó n = 6 là số lần phân tích lặp lại.

Độ lệch chuẩn tương đối $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

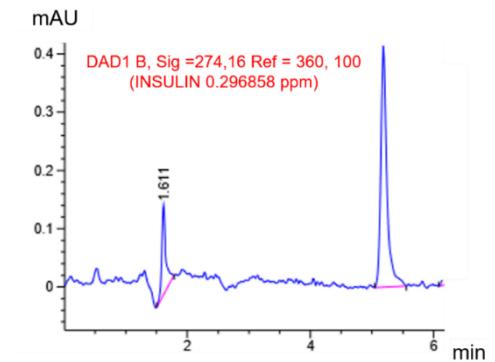
Phụ lục 6. Hiệu suất thu hồi cortisol từ mẫu huyết tương cá rô đồng (n = 3)

Mẫu	Nồng độ cortisol trong máu cá (ng/mL)	Nồng độ cortisol chuẩn thêm vào (ng/mL)	Nồng độ cortisol đo được (ng/mL)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	52,40	98,80	149,93	98,72
2	51,64		147,15	96,67
3	51,57		148,70	98,31
Trung bình	51,87		148,59	97,90
SD	0,46		1,39	1,08
RSD (%)	0,89		0,94	1,11

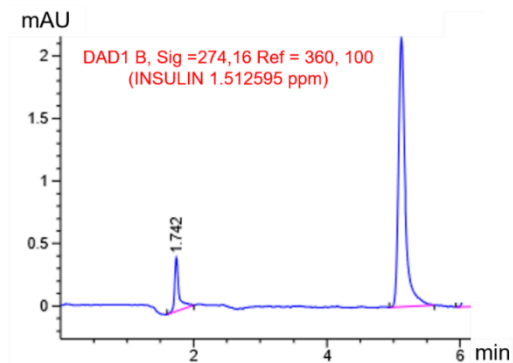
Phụ lục 7. Sắc ký đồ các mẫu insulin chuẩn từ 0,155 mg/L đến 3,029 mg/L



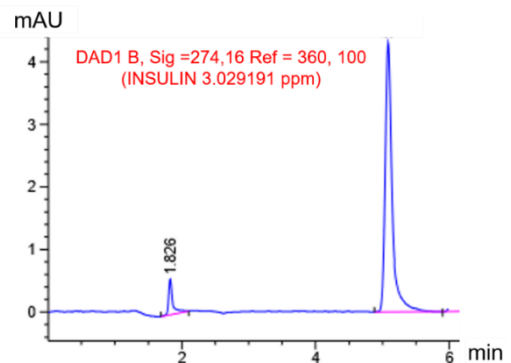
Insulin 0,155 mg/L



Insulin 0,297 mg/L



Insulin 1,513 mg/L



Insulin 3,029 mg/L

Phụ lục 8. Thông số xác định phương trình hồi quy của insulin

		Value	Standard Error
B	Intercept	-0.02519	0.12169
	Slope	10.16743	0.07998

Statistics

	B
Number of Points	5
Degrees of Freedom	3
Residual Sum of Squares	0.12642
Pearson's r	0.99991
Adj. R-Square	0.99975

Summary

	Intercept		Slope		Statistics
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Adj. R-Square
B	-0.02519	0.12169	10.16743	0.07998	0.99975

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Model	1	681.06918	681.06918	16161.50942	1.07313E-6
	Error	3	0.12642	0.04214		
	Total	4	681.19561			

Phụ lục 9. Khảo sát sai số của đường chuẩn insulin

<i>Nồng độ (mg/L)</i>	<i>Chuẩn</i>	<i>Diện tích đỉnh</i>	<i>Diện tích trung bình ($\bar{X}$)</i>	<i>Độ lệch chuẩn (SD)</i>	<i>RSD (%)</i>
0,155	Chuẩn 1	1,7218	1,653	0,070	4,22
	Chuẩn 2	1,5825			
	Chuẩn 3	1,6546			
0,297	Chuẩn 1	2,9393	2,970	0,097	3,28
	Chuẩn 2	2,8910			
	Chuẩn 3	3,0785			
1,513	Chuẩn 1	15,0833	15,041	0,196	1,31
	Chuẩn 2	15,2123			
	Chuẩn 3	14,8264			
3,029	Chuẩn 1	30,9059	30,622	0,747	2,44
	Chuẩn 2	31,1852			
	Chuẩn 3	29,7751			

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^n \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó $n = 3$ là số lần phân tích lặp lại

Độ lệch chuẩn tương đối: $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 10. Kết quả độ lặp lại và độ tái lặp của insulin

Nồng độ chuẩn (mg/L)	Số lần đo	S (mAU)	
		Phân tích trong ngày	Phân tích giữa các ngày
0,297	1	2,83925	2,79312
	2	2,98536	2,81221
	3	2,95991	2,89190
	4	3,13925	3,02257
	5	3,19523	3,11231
	6	3,01993	2,91257
	Trung bình	3,02315	2,92411
	SD	0,12833	0,12326
	RSD (%)	4,25	4,22
1,513	1	15,18372	15,08372
	2	14,81127	14,61212
	3	14,78321	14,67321
	4	15,23782	15,00222
	5	15,42781	15,12715
	6	14,73270	14,67322
	Trung bình	15,02942	14,86194
	SD	0,29059	0,23360
	RSD (%)	1,93	1,57

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^n \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó n = 6 là số lần phân tích lặp lại.

Độ lệch chuẩn tương đối $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 11. Số liệu về độ chụm và độ đúng (n = 6) trong phân tích insulin

Thông số	Nồng độ insulin			
	Chuẩn 303,0 ng/mL		Chuẩn 1515,0 ng/mL	
	Đo trong ngày	Đo giữa các ngày	Đo trong ngày	Đo giữa các ngày
1	282,44	277,90	1496,25	1486,42
2	296,81	279,78	1459,63	1440,05
3	294,30	287,62	1456,87	1446,05
4	311,94	300,46	1501,57	1478,40
5	317,44	309,29	1520,25	1490,69
6	300,21	289,65	1451,90	1446,05
Trung bình	300,52	290,78	1481,08	1464,61
SD	12,62	12,12	28,57	22,97
RSD (%) của độ chụm	4,20	4,17	1,93	1,57
Độ đúng (%)	99,18	97,76	95,97	96,67

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^n \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó n = 6 là số lần phân tích lặp lại.

Độ lệch chuẩn tương đối $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 12. Hiệu suất thu hồi insulin từ mẫu máu cá rô đồng (n = 3)

Mẫu	Nồng độ insulin trong máu cá (ng/mL)	Nồng độ insulin chuẩn thêm vào (ng/mL)	Nồng độ insulin đo được (ng/mL)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	33,32	1515,0	1521,94	98,26
2	28,62		1491,25	96,54
3	30,32		1532,94	99,18
Trung bình	30,75		1515,38	98,00
SD	2,38		21,60	1,34
RSD (%)	7,74		1,43	1,37

Phụ lục 13. Chuẩn bị dãy dung dịch glycogen-IKI chuẩn khảo sát ở bước sóng 460nm

	Bình 1	Bình 2	Bình 3	Bình 4	Bình 5	Bình 6	Bình 7
V _{glycogen} (0,5 mg/mL) (mL)	0	0,1	0,2	0,5	1,0	1,2	1,4
V _{H₂O} (mL)	5	4,8	4,7	4,4	3,9	3,7	3,5
V _{thuốc thử IKI} (mL)	0,1 mL						
Lắc vortex để yên trong 20 phút, đo ở bước sóng 460 nm							
C _{glycogen} (mg/L)	0	10,0	20,0	50,0	100,0	120,0	140,0

Phụ lục 14. Thông số xác định phương trình hồi quy của glycogen

		Value	Standard Error
B	Intercept	5.00217E-8	1.0642E-5
	Slope	0.00781	1.29377E-4

Statistics

	B
Number of Points	7
Degrees of Freedom	5
Residual Sum of Squares	5.66265
Pearson's r	0.99932
Adj. R-Square	0.99836

Summary

	Intercept		Slope		Statistics
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Adj. R-Square
B	5.00217E-8	1.0642E-5	0.00781	1.29377E-4	0.99836

ANOVA

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Model	1	4132.21488	4132.21488	3648.65761	2.3534E-8
	Error	5	5.66265	1.13253		
	Total	6	4137.87753			

Phụ lục 15. Kết quả độ lặp lại và độ tái lặp của glycogen

<i>Nồng độ glycogen chuẩn (mg/L)</i>	<i>Số lần đo</i>	<i>Abs</i>	
		<i>Phân tích trong ngày</i>	<i>Phân tích giữa các ngày</i>
10,0	1	0,080	0,078
	2	0,074	0,073
	3	0,072	0,071
	4	0,073	0,075
	5	0,074	0,072
	6	0,081	0,078
	Trung bình	0,076	0,075
	SD	0,004	0,003
	RSD (%)	5,061	4,049
50,0	1	0,379	0,372
	2	0,400	0,387
	3	0,386	0,384
	4	0,390	0,378
	5	0,395	0,376
	6	0,370	0,368
	Trung bình	0,387	0,378
	SD	0,011	0,007
	RSD (%)	2,822	1,894

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^n \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó n = 6 là số lần phân tích lặp lại.

Độ lệch chuẩn tương đối: $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 16. Số liệu về độ chụm và độ đúng (n = 6) phân tích glycogen

Thông số	Nồng độ glycogen			
	Chuẩn 10,0 mg/L		Chuẩn 50,0 mg/L	
	Đo trong ngày	Đo giữa các ngày	Đo trong ngày	Đo giữa các ngày
1	10,24	9,987	48,528	47,631
2	9,48	9,347	51,216	49,552
3	9,22	9,091	49,424	49,168
4	9,35	9,603	49,936	48,399
5	9,48	9,219	50,576	48,143
6	10,37	9,987	47,375	47,119
Trung bình	9,69	9,539	49,509	48,335
SD	0,49	0,39	1,40	0,915
RSD (%) của độ chụm	5,06	4,05	2,82	1,89
Độ đúng (%)	96,88	95,39	99,02	96,67

Với $SD^2 = \sum_{i=1}^n \frac{x_i - \bar{x}}{n-1}$ trong đó n = 6 là số lần phân tích lặp lại.

Độ lệch chuẩn tương đối: $RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$

Phụ lục 17. Hiệu suất thu hồi glycogen từ mẫu gan cá rô đồng (n = 3)

Mẫu	Nồng độ glycogen trong gan cá (mg/L)	Nồng độ glycogen chuẩn thêm vào (mg/L)	Nồng độ glycogen đo được (mg/L)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	44,27	10,0	53,71	98,26
2	45,76		54,97	96,54
3	43,44		52,90	99,18
Trung bình	44,49		53,86	93,70
SD	1,18		1,04	1,39
RSD (%)	2,64		1,94	1,48

Phụ lục 18. Độ chụm quy trình xử lý mẫu xác định Pb

<i>Kim loại</i>	<i>Bộ phận</i>	<i>Lần phân tích</i>			<i>RSD (%)</i>
		<i>Lần 1</i>	<i>Lần 2</i>	<i>Lần 3</i>	
Pb (µg/kg)	Mang	192,4	183,4	200,1	4,4
	Gan	105,7	113,7	110,5	3,7
	Thịt	53,1	50,8	55,4	4,3

Phụ lục 19. Hiệu suất thu hồi quy trình mẫu xác định Pb

Lần phân tích	Nồng độ Pb trong mẫu phân tích (µg/kg)	Nồng độ Pb chuẩn thêm vào (µg/kg)	Nồng độ Pb tìm thấy (µg/kg)	Nồng độ thu hồi (µg/kg)	Hiệu suất thu hồi %
Lần 1	11,65	50,00	57,28	9,126	91,26
Lần 2	13,03		60,08	9,410	94,10
Lần 3	12,82		58,44	9,124	91,24
Trung bình				9,220	92,20
SD				0,165	1,645
RSD (%)				1,785	

Phụ lục 20. Độ chụm quy trình xử lý mẫu xác định Cd

<i>Kim loại</i>	<i>Bộ phận</i>	<i>Lần phân tích</i>			<i>RSD (%)</i>
		<i>Lần 1</i>	<i>Lần 2</i>	<i>Lần 3</i>	
Cd (µg/kg)	Mang	11,20	11,60	12,80	9,00
	Gan	11,50	12,70	12,90	6,10
	Thịt	9,20	8,40	9,90	8,20

Phụ lục 21. Hiệu suất thu hồi quy trình mẫu xác định Cd

<i>Lần phân tích</i>	<i>Nồng độ Cd trong mẫu phân tích (µg/kg)</i>	<i>Nồng độ Cd chuẩn thêm vào (µg/kg)</i>	<i>Nồng độ Cd tìm thấy (µg/kg)</i>	<i>Nồng độ thu hồi (µg/kg)</i>	<i>Hiệu suất thu hồi %</i>
Lần 1	10,08	50,0	55,58	9,10	91,0
Lần 2	9,36		56,41	9,41	94,1
Lần 3	8,04		57,09	9,81	98,1
Trung bình				9,440	94,40
SD				0,356	3,559
RSD (%)				3,771	

Phụ lục 22. Tỷ lệ cá rô đồng chết trong 96 giờ ở các nồng độ Pb khác nhau

<i>Nồng độ Pb</i>	<i>Thí nghiệm</i>	<i>% cá thí nghiệm chết theo thời gian</i>				
		<i>0 giờ</i>	<i>24 giờ</i>	<i>48 giờ</i>	<i>72 giờ</i>	<i>96 giờ</i>
30 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	0,00	6,67	26,67
	Lần 2	0,00	0,00	0,00	6,67	20,00
	Lần 3	0,00	0,00	0,00	6,67	33,33
	Lần 4	0,00	0,00	0,00	6,67	26,67
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	0,00	6,67 $\pm$ 0,00	26,67 $\pm$ 5,44
90 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	0,00	13,33	33,33
	Lần 2	0,00	0,00	0,00	13,33	26,67
	Lần 3	0,00	0,00	0,00	13,33	40,00
	Lần 4	0,00	0,00	0,00	13,33	33,33
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	0,00	13,33 $\pm$ 0,00	33,33 $\pm$ 5,44
100 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	20,00	33,33	46,67
	Lần 2	0,00	0,00	33,33	33,33	33,33
	Lần 3	0,00	0,00	33,33	40,00	46,67
	Lần 4	0,00	0,00	20,00	26,67	33,33
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	26,67 $\pm$ 7,70	33,33 $\pm$ 5,44	40,00 $\pm$ 7,70
150 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	33,33	60,00	66,67
	Lần 2	0,00	0,00	33,33	46,67	66,67
	Lần 3	0,00	0,00	46,67	53,33	73,33
	Lần 4	0,00	0,00	46,67	53,33	60,00
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	40,00 $\pm$ 7,70	53,33 $\pm$ 5,44	66,67 $\pm$ 5,44

<i>Nồng độ Pb</i>	<i>Thí nghiệm</i>	<i>% cá thí nghiệm chết theo thời gian</i>				
		<i>0 giờ</i>	<i>24 giờ</i>	<i>48 giờ</i>	<i>72 giờ</i>	<i>96 giờ</i>
175 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	40,00	60,00	80,00
	Lần 2	0,00	0,00	33,33	73,33	93,33
	Lần 3	0,00	0,00	46,67	73,33	73,33
	Lần 4	0,00	0,00	40,00	60,00	73,33
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	40,00 $\pm$ 5,44	66,67 $\pm$ 7,70	80,00 $\pm$ 9,43
200 mg/L	Lần 1	0,00	33,33	86,67	93,33	93,33
	Lần 2	0,00	26,67	86,67	93,33	93,33
	Lần 3	0,00	40,00	73,33	86,67	93,33
	Lần 4	0,00	33,33	73,33	93,33	93,33
	Mean $\pm$ SD	0,00	33,33 $\pm$ 5,44	80,00 $\pm$ 7,70	91,67 $\pm$ 3,33	93,33 $\pm$ 0,00

Phụ lục 23. Ảnh hưởng của Pb đến sự phát triển của cá rô đồng (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thời gian</i>	<i>Chiều dài (cm)</i>				<i>Trọng lượng (g)</i>			
	<i>Đối chứng</i>	<i>20Pb</i>	<i>30Pb</i>	<i>40Pb</i>	<i>Đối chứng</i>	<i>20Pb</i>	<i>30Pb</i>	<i>40Pb</i>
Bắt đầu nuôi ô nhiễm	8.9 ± 0.4	8.4 ± 0.3	9.3 ± 0.4	9.2 ± 0.2	$14,52 \pm 0,28$	$12,92 \pm 0,51$	$12,49 \pm 0,46$	$13,05 \pm 0,33$
Ngày thứ 7	8.9 ± 0.4 ($\uparrow 0\%$) ^(a)	8.6 ± 0.6 ($\uparrow 2.4\%$) ^(a)	9.60 ± 0.5 ($\uparrow 3.2\%$) ^(a)	9.4 ± 0.3 ($\uparrow 2.2\%$) ^(a)	15.33 ± 0.48 ($\uparrow 5.58\%$) ^(a)	12.76 ± 0.44 ($\downarrow 1.24\%$) ^(a)	12.35 ± 0.25 ($\downarrow 1.12\%$) ^(a)	12.59 ± 0.28 ($\downarrow 3.52\%$) ^(a)
Ngày thứ 14	9.1 ± 0.2 ($\uparrow 2.2\%$) ^(a)	8.7 ± 0.7 ($\uparrow 3.6\%$) ^(a)	9.60 ± 0.5 ($\uparrow 3.2\%$) ^(a)	9.4 ± 0.4 ($\uparrow 2.2\%$) ^(a)	15.36 ± 0.48 ($\uparrow 5.79\%$) ^(a)	12.75 ± 0.30 ($\downarrow 1.32\%$) ^(a)	12.46 ± 0.32 ($\downarrow 0.24\%$) ^(a)	12.72 ± 0.34 ($\downarrow 2.53\%$) ^(a)
Ngày thứ 21	9.2 ± 0.3 ($\uparrow 3.7\%$) ^(a)	8.8 ± 0.6 ($\uparrow 4.8\%$) ^(a)	9.7 ± 0.5 ($\uparrow 4.3\%$) ^(a)	9.4 ± 0.3 ($\uparrow 2.5\%$) ^(a)	16.20 ± 0.44 ($\uparrow 11.57\%$) ^(a)	13.65 ± 0.43 ($\uparrow 5.65\%$) ^(a)	13.13 ± 0.42 ($\uparrow 5.12\%$) ^(a)	13.37 ± 0.35 ($\uparrow 2.45\%$) ^(a)
Ngày thứ 28	9.6 ± 0.3 ($\uparrow 8.2\%$) ^(a)	8.9 ± 0.6 ($\uparrow 6.0\%$) ^(a)	9.60 ± 0.5 ($\uparrow 3.2\%$) ^(a)	9.4 ± 0.4 ($\uparrow 2.5\%$) ^(a)	15.89 ± 0.49 ($\uparrow 9.44\%$) ^(a)	13.89 ± 0.38 ($\uparrow 7.51\%$) ^(a)	13.03 ± 0.25 ($\uparrow 4.32\%$) ^(a)	13.51 ± 0.39 ($\uparrow 3.52\%$) ^(a)

^(a): Tỷ lệ tăng trưởng của cá sau thời gian phơi nhiễm so với thời gian bắt đầu nuôi ô nhiễm

Phụ lục 24. Hàm lượng Pb tích lũy tại mang cá rô đồng trong 28 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Tích lũy Pb tại mang cá (mg/kg mang khô)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	20,89	23,10	20,30	21,09
	L2	18,75	20,10	23,80	23,42
	L3	22,40	19,50	18,10	17,50
	Mean $\pm$ SD	20,68 $\pm$ 1,83	20,90 $\pm$ 1,93	20,73 $\pm$ 2,87	20,67 $\pm$ 2,98
20 mgPb/L	L1	97,57	191,05	231,81	283,71
	L2	95,25	187,16	235,89	289,10
	L3	99,90	194,95	227,72	278,32
	Mean $\pm$ SD	97,57 $\pm$ 2,33	191,05 $\pm$ 3,90	231,81 $\pm$ 4,09	283,71 $\pm$ 5,39
30 mgPb/L	L1	151,35	252,25	281,05	296,22
	L2	145,35	248,67	276,67	289,20
	L3	157,36	255,82	285,42	303,25
	Mean $\pm$ SD	151,35 $\pm$ 6,01	252,25 $\pm$ 3,58	281,05 $\pm$ 4,38	296,22 $\pm$ 7,03
40 mgPb/L	L1	146,27	176,98	297,06	471,84
	L2	153,40	170,92	305,34	475,75
	L3	139,15	183,03	288,78	467,92
	Mean $\pm$ SD	146,27 $\pm$ 7,13	176,98 $\pm$ 6,06	297,06 $\pm$ 8,28	471,84 $\pm$ 3,92

Phụ lục 25. Hàm lượng Pb tích lũy tại gan cá rô đồng trong 28 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Tích lũy Pb tại gan cá (mg/kg gan khô)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	0,53	0,56	0,50	0,48
	L2	0,47	0,45	0,75	0,55
	L3	0,69	0,71	0,49	0,70
	Mean $\pm$ SD	0,56 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,13	0,58 $\pm$ 0,15	0,58 $\pm$ 0,11
20 mgPb/L	L1	18,12	79,27	116,37	123,39
	L2	19,59	84,17	121,33	119,62
	L3	16,30	77,37	113,42	129,69
	Mean $\pm$ SD	18,00 $\pm$ 1,65	80,27 $\pm$ 3,51	117,04 $\pm$ 4,00	124,23 $\pm$ 5,09
30 mgPb/L	L1	36,06	92,49	125,12	127,69
	L2	33,58	98,85	129,36	120,39
	L3	38,92	89,11	117,43	132,23
	Mean $\pm$ SD	36,19 $\pm$ 2,67	93,48 $\pm$ 4,95	123,97 $\pm$ 6,05	126,77 $\pm$ 5,97
40 mgPb/L	L1	35,75	98,71	124,58	173,15
	L2	40,12	91,36	131,12	169,67
	L3	32,91	103,32	119,78	180,53
	Mean $\pm$ SD	36,26 $\pm$ 3,63	97,80 $\pm$ 6,03	125,16 $\pm$ 5,69	174,45 $\pm$ 5,55

Phụ lục 26. Hàm lượng Pb tích lũy tại thịt cá rô đồng trong 28 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Tích lũy Pb tại thịt cá (mg/kg thịt khô)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	0,56	0,49	0,57	0,44
	L2	0,47	0,55	0,50	0,64
	L3	0,65	0,68	0,70	0,73
	Mean $\pm$ SD	0,56 $\pm$ 0,09	0,57 $\pm$ 0,10	0,59 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,15
20 mgPb/L	L1	28,65	59,21	68,39	65,83
	L2	27,15	54,76	63,67	63,31
	L3	33,20	66,30	76,14	74,35
	Mean $\pm$ SD	29,67 $\pm$ 3,15	60,09 $\pm$ 5,82	69,40 $\pm$ 6,30	67,83 $\pm$ 5,79
30 mgPb/L	L1	39,37	63,78	89,17	74,18
	L2	47,59	69,70	95,84	80,53
	L3	36,15	60,69	86,60	72,11
	Mean $\pm$ SD	41,04 $\pm$ 5,90	64,72 $\pm$ 4,58	90,54 $\pm$ 4,77	75,61 $\pm$ 4,39
40 mgPb/L	L1	34,59	89,90	93,10	151,28
	L2	39,83	95,90	89,59	149,33
	L3	30,72	86,80	100,84	160,18
	Mean $\pm$ SD	35,05 $\pm$ 4,57	90,87 $\pm$ 4,63	94,51 $\pm$ 5,76	153,60 $\pm$ 5,78

Phụ lục 27. Hàm lượng cortisol trong huyết tương cá rô đồng sau 28 ngày sống trong môi trường ô nhiễm Pb

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Lượng cortisol trong huyết tương (ng/mL)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	33,06	33,14	33,37	33,23
	L2	34,23	34,27	34,42	34,13
	L3	33,92	33,55	34,21	33,40
	Mean $\pm$ SD	33,74 $\pm$ 0,61	33,65 $\pm$ 0,57	34,00 $\pm$ 0,56	33,59 $\pm$ 0,48
20 mgPb/L	L1	76,69	67,97	65,88	48,79
	L2	77,92	66,86	67,23	49,32
	L3	77,29	67,51	66,24	49,67
	Mean $\pm$ SD	77,30 $\pm$ 0,62	67,45 $\pm$ 0,56	66,45 $\pm$ 0,70	49,26 $\pm$ 0,44
30 mgPb/L	L1	89,53	72,04	60,48	71,63
	L2	90,15	73,13	58,55	71,00
	L3	88,76	73,54	59,46	70,59
	Mean $\pm$ SD	89,48 $\pm$ 0,70	72,90 $\pm$ 0,78	59,50 $\pm$ 0,97	71,07 $\pm$ 0,52
40 mgPb/L	L1	92,83	82,32	54,82	81,91
	L2	92,15	81,06	56,47	80,59
	L3	91,16	81,76	55,90	81,04
	Mean $\pm$ SD	92,05 $\pm$ 0,84	81,71 $\pm$ 0,63	55,73 $\pm$ 0,84	81,18 $\pm$ 0,67

Phụ lục 28. Hàm lượng insulin trong máu cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm Pb

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Lượng insulin trong máu (ng/mL)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	24,71	24,65	23,13	24,32
	L2	23,32	23,67	24,81	23,71
	L3	23,67	23,23	23,06	24,00
	Mean $\pm$ SD	23,90 $\pm$ 0,72	23,85 $\pm$ 0,73	23,67 $\pm$ 0,99	24,01 $\pm$ 0,31
20 mgPb/L	L1	8,89	3,55	4,78	5,83
	L2	8,24	4,14	5,22	5,17
	L3	8,13	3,32	5,16	5,06
	Mean $\pm$ SD	8,42 $\pm$ 0,41	3,67 $\pm$ 0,42	5,05 $\pm$ 0,24	5,35 $\pm$ 0,42
30 mgPb/L	L1	4,37	2,91	4,61	4,83
	L2	3,74	2,45	4,18	4,10
	L3	4,10	2,30	4,13	4,34
	Mean $\pm$ SD	4,07 $\pm$ 0,32	2,55 $\pm$ 0,32	4,31 $\pm$ 0,26	4,42 $\pm$ 0,37
40 mgPb/L	L1	3,23	1,21	3,77	3,80
	L2	3,15	1,81	3,70	3,99
	L3	3,94	1,30	3,21	4,25
	Mean $\pm$ SD	3,44 $\pm$ 0,43	1,44 $\pm$ 0,32	3,56 $\pm$ 0,31	4,01 $\pm$ 0,23

Phụ lục 29. Hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm Pb

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Lượng glycogen (mg/g)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	90,88	90,92	90,15	90,68
	L2	90,00	90,15	89,80	89,90
	L3	91,05	91,00	90,32	90,40
	Mean $\pm$ SD	90,64 $\pm$ 0,56	90,69 $\pm$ 0,47	90,09 $\pm$ 0,27	90,33 $\pm$ 0,40
20 mgPb/L	L1	68,36	58,44	58,58	57,25
	L2	68,05	58,12	58,23	57,00
	L3	68,77	58,78	59,00	57,60
	Mean $\pm$ SD	68,39 $\pm$ 0,36	58,45 $\pm$ 0,33	58,60 $\pm$ 0,39	57,28 $\pm$ 0,30
30 mgPb/L	L1	55,54	44,22	45,10	45,29
	L2	55,05	43,78	45,45	45,00
	L3	56,10	44,90	45,87	45,83
	Mean $\pm$ SD	55,56 $\pm$ 0,53	44,30 $\pm$ 0,56	45,47 $\pm$ 0,39	45,37 $\pm$ 0,42
40 mgPb/L	L1	45,31	37,32	38,45	38,55
	L2	45,54	36,90	38,98	38,88
	L3	44,96	37,73	37,90	38,00
	Mean $\pm$ SD	45,27 $\pm$ 0,29	37,32 $\pm$ 0,42	38,44 $\pm$ 0,54	38,48 $\pm$ 0,44

Phụ lục 30. Chiều dài và trọng lượng của cá rô đồng sau 14 ngày thôi nhiễm Pb (Giá trị chính $\pm$ độ lệch chuẩn, n = 3)

Thí nghiệm	Kích thước của cá rô đồng (cm)			Trọng lượng của cá rô đồng (g)		
	<i>Ngày đầu tiên bắt đầu phơi nhiễm</i>	<i>Ngày thứ 28 (phơi nhiễm)</i>	<i>Ngày thứ 14 (thôi nhiễm)</i>	<i>Ngày đầu tiên bắt đầu phơi nhiễm</i>	<i>Ngày thứ 28 (phơi nhiễm)</i>	<i>Ngày thứ 14 (thôi nhiễm)</i>
Đối chứng	$8,90 \pm 0,40$	$9,63 \pm 0,30$ ($\uparrow 8,20\%$) ^a	$10,90 \pm 0,30$ ($\uparrow 22,50\%$) ^a ($\uparrow 13,20\%$) ^b	$14,52 \pm 0,28$	$15,89 \pm 0,49$ ($\uparrow 9,44\%$) ^a	$17,17 \pm 0,35$ ($\uparrow 18,25\%$) ^b ($\uparrow 8,06\%$) ^c
20Pb	$8,40 \pm 0,30$	$8,90 \pm 0,60$ ($\uparrow 6,00\%$) ^a	$9,70 \pm 0,30$ ($\uparrow 15,10\%$) ^a ($\uparrow 8,70\%$) ^b	$12,92 \pm 0,51$	$13,89 \pm 0,38$ ($\uparrow 7,51\%$) ^a	$14,68 \pm 0,28$ ($\uparrow 13,62\%$) ^b ($\uparrow 5,69\%$) ^c
30Pb	$9,30 \pm 0,40$	$9,60 \pm 0,50$ ($\uparrow 3,20\%$) ^a	$10,10 \pm 0,30$ ($\uparrow 8,90\%$) ^a ($\uparrow 5,50\%$) ^b	$12,49 \pm 0,46$	$13,03 \pm 0,25$ ($\uparrow 4,32\%$) ^a	$13,55 \pm 0,48$ ($\uparrow 8,49\%$) ^b ($\uparrow 3,99\%$) ^c
40Pb	$9,17 \pm 0,20$	$9,40 \pm 0,40$ ($\uparrow 2,50\%$) ^a	$9,80 \pm 0,20$ ($\uparrow 6,50\%$) ^a ($\uparrow 3,90\%$) ^b	$13,05 \pm 0,33$	$13,51 \pm 0,39$ ($\uparrow 3,52\%$) ^a	$13,77 \pm 0,31$ ($\uparrow 5,52\%$) ^b ($\uparrow 1,92\%$) ^c

^a: Tăng so với ngày bắt đầu phơi nhiễm Pb;^b: Tăng so với ngày thứ 28 của giai đoạn phơi nhiễm.

Phụ lục 31. Hàm lượng Pb trong các mô của cá rô đồng sau 14 ngày thôi nhiễm

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Hàm lượng Pb còn trong mô cá (mg/kg)</i>		
		<i>Mang cá</i>	<i>Gan cá</i>	<i>Thịt cá</i>
Sau 28 ngày phơi nhiễm				
20 mgPb/L	L1	283,71	123,39	65,83
	L2	289,10	119,62	63,31
	L3	278,32	129,69	74,35
	Mean $\pm$ SD	283,71 $\pm$ 5,39	124,23 $\pm$ 5,09	67,83 $\pm$ 5,79
30 mgPb/L	L1	296,22	127,69	74,18
	L2	289,20	120,39	80,53
	L3	303,25	132,23	72,11
	Mean $\pm$ SD	296,22 $\pm$ 7,03	126,77 $\pm$ 5,97	75,61 $\pm$ 4,39
40 mgPb/L	L1	471,84	173,15	151,28
	L2	475,75	169,67	149,33
	L3	467,92	180,53	160,18
	Mean $\pm$ SD	471,84 $\pm$ 3,92	174,45 $\pm$ 5,55	153,60 $\pm$ 5,78
Sau 14 ngày thôi nhiễm				
20 mgPb/L	L1	191,05	88,72	49,21
	L2	195,16	92,17	45,15
	L3	194,95	97,37	47,53
	Mean $\pm$ SD	193,72 $\pm$ 2,31	92,75 $\pm$ 4,35	47,30 $\pm$ 2,04
30 mgPb/L	L1	252,25	102,49	56,78
	L2	248,67	98,85	60,37
	L3	255,82	99,71	53,69
	Mean $\pm$ SD	252,25 $\pm$ 3,58	100,35 $\pm$ 1,90	56,95 $\pm$ 3,34
40 mgPb/L	L1	176,98	140,97	139,17
	L2	178,92	137,36	135,54
	L3	183,03	138,42	137,50
	Mean $\pm$ SD	179,64 $\pm$ 3,09	138,92 $\pm$ 1,86	137,40 $\pm$ 1,82

Phụ lục 32. Tỷ lệ cá rô đồng chết trong 96 giờ ở các nồng độ Cd khác nhau

Nồng độ Cd	Thí nghiệm	% cá thí nghiệm chết theo thời gian				
		0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
3 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5 mg/L	Lần 1	0,00	0,00	0,00	6,67	6,67
	Lần 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Lần 3	0,00	0,00	0,00	13,33	13,33
	Lần 4	0,00	0,00	0,00	6,67	6,67
	Mean $\pm$ SD	0,00	0,00	0,00	6,67 $\pm$ 5,44	6,67 $\pm$ 5,44
10 mg/L	Lần 1	0,00	6,67	20,00	20,00	20,00
	Lần 2	0,00	6,67	6,67	20,00	20,00
	Lần 3	0,00	6,67	13,33	26,67	26,67
	Lần 4	0,00	6,67	13,33	13,33	13,33
	Mean $\pm$ SD	0,00	6,67 $\pm$ 0,00	13,33 $\pm$ 5,44	20,00 $\pm$ 5,44	20,00 $\pm$ 5,44
20 mg/L	Lần 1	0,00	13,33	13,33	13,33	33,33
	Lần 2	0,00	6,67	6,67	26,67	33,33
	Lần 3	0,00	13,33	13,33	20,00	20,00
	Lần 4	0,00	20,00	20,00	20,00	20,00
	Mean $\pm$ SD	0,00	13,33 $\pm$ 5,44	13,33 $\pm$ 5,44	20,00 $\pm$ 5,44	26,67 $\pm$ 7,70
30 mg/L	Lần 1	0,00	13,33	26,67	26,67	53,33
	Lần 2	0,00	6,67	33,33	40,00	40,00
	Lần 3	0,00	20,00	26,67	40,00	46,67
	Lần 4	0,00	13,33	20,00	26,67	46,67
	Mean $\pm$ SD	0,00	13,33 $\pm$ 5,44	26,67 $\pm$ 5,44	33,33 $\pm$ 7,70	46,67 $\pm$ 5,44

<i>Nồng độ Cd</i>	<i>Thí nghiệm</i>	<i>% cá thí nghiệm chết theo thời gian</i>				
		<i>0 giờ</i>	<i>24 giờ</i>	<i>48 giờ</i>	<i>72 giờ</i>	<i>96 giờ</i>
40 mg/L	Lần 1	0,00	20,00	40,00	53,33	60,00
	Lần 2	0,00	20,00	33,33	60,00	66,67
	Lần 3	0,00	20,00	40,00	40,00	53,33
	Lần 4	0,00	20,00	46,67	60,00	60,00
	Mean $\pm$ SD	0,00	20,00 $\pm$ 0,00	40,00 $\pm$ 5,44	53,33 $\pm$ 9,43	60,00 $\pm$ 5,44
50 mg/L	Lần 1	0,00	40,00	53,33	53,33	80,00
	Lần 2	0,00	33,33	40,00	53,33	66,67
	Lần 3	0,00	46,67	53,33	73,33	73,33
	Lần 4	0,00	40,00	40,00	60,00	73,33
	Mean $\pm$ SD	0,00	40,00 $\pm$ 5,44	46,67 $\pm$ 7,70	60,00 $\pm$ 9,43	73,33 $\pm$ 5,44
75 mg/L	Lần 1	0,00	80,00	80,00	93,33	93,33
	Lần 2	0,00	73,33	80,00	86,67	86,67
	Lần 3	0,00	86,67	86,67	93,33	93,33
	Lần 4	0,00	80,00	100,00	100,00	100,00
	Mean $\pm$ SD	0,00	80,00 $\pm$ 5,44	86,67 $\pm$ 9,43	93,33 $\pm$ 5,44	93,33 $\pm$ 5,44

Phụ lục 33. Ảnh hưởng của Cd đến sự phát triển của cá rô đồng (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thời gian</i>	<i>Chiều dài (cm)</i>				<i>Trọng lượng (g)</i>			
	<i>Đối chứng</i>	<i>3Cd</i>	<i>5Cd</i>	<i>10Cd</i>	<i>Đối chứng</i>	<i>3Cd</i>	<i>5Cd</i>	<i>10Cd</i>
Bắt đầu nuôi ô nhiễm	$8,90 \pm 0,40$	$9,10 \pm 0,20$	$9,10 \pm 0,30$	$9,30 \pm 0,30$	$14,52 \pm 0,28$	$12,36 \pm 0,41$	$12,32 \pm 0,50$	$12,24 \pm 0,46$
Ngày thứ 7	$8,90 \pm 0,40$ ($\uparrow 0\%$) ^(a)	$9,10 \pm 0,20$ ($\uparrow 0,40\%$) ^(a)	$9,20 \pm 0,50$ ($\uparrow 1,10\%$) ^(a)	$9,40 \pm 0,50$ ($\uparrow 0,90\%$) ^(a)	$15,33 \pm 0,48$ ($\uparrow 5,58\%$) ^(a)	$12,68 \pm 0,43$ ($\uparrow 2,59\%$) ^(a)	$12,50 \pm 0,46$ ($\uparrow 1,43\%$) ^(a)	$12,36 \pm 0,47$ ($\uparrow 0,97\%$) ^(a)
Ngày thứ 14	$9,10 \pm 0,20$ ($\uparrow 2,2\%$) ^(a)	$9,20 \pm 0,30$ ($\uparrow 1,40\%$) ^(a)	$9,20 \pm 0,30$ ($\uparrow 0,50\%$) ^(a)	$9,40 \pm 0,50$ ($\uparrow 1,10\%$) ^(a)	$15,36 \pm 0,48$ ($\uparrow 5,79\%$) ^(a)	$12,92 \pm 0,41$ ($\uparrow 4,53\%$) ^(a)	$12,74 \pm 0,34$ ($\uparrow 3,38\%$) ^(a)	$12,52 \pm 0,57$ ($\uparrow 2,29\%$) ^(a)
Ngày thứ 21	$9,20 \pm 0,30$ ($\uparrow 3,70\%$) ^(a)	$9,30 \pm 0,30$ ($\uparrow 2,40\%$) ^(a)	$9,30 \pm 0,40$ ($\uparrow 1,80\%$) ^(a)	$9,40 \pm 0,60$ ($\uparrow 1,50\%$) ^(a)	$16,20 \pm 0,44$ ($\uparrow 11,57\%$) ^(a)	$13,02 \pm 0,48$ ($\uparrow 5,34\%$) ^(a)	$12,86 \pm 0,37$ ($\uparrow 4,35\%$) ^(a)	$12,68 \pm 0,48$ ($\uparrow 3,59\%$) ^(a)
Ngày thứ 28	$9,60 \pm 0,30$ ($\uparrow 8,20\%$) ^(a)	$9,50 \pm 0,40$ ($\uparrow 5,30\%$) ^(a)	$9,50 \pm 0,40$ ($\uparrow 3,60\%$) ^(a)	$9,60 \pm 0,50$ ($\uparrow 3,00\%$) ^(a)	$15,89 \pm 0,49$ ($\uparrow 9,44\%$) ^(a)	$13,11 \pm 0,57$ ($\uparrow 6,07\%$) ^(a)	$13,00 \pm 0,65$ ($\uparrow 5,49\%$) ^(a)	$12,80 \pm 0,52$ ($\uparrow 4,58\%$) ^(a)

^(a): Tỷ lệ tăng trưởng của cá sau thời gian phơi nhiễm so với thời gian bắt đầu nuôi ô nhiễm

Phụ lục 34. Hàm lượng Cd tích lũy tại mang cá rô đồng trong 28 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Tổng lượng Cd tích lũy tại mang cá (mg/kg mang khô)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	2,16	2,21	2,25	2,13
	L2	2,05	1,93	2,10	2,30
	L3	2,00	2,10	2,05	2,10
	Mean $\pm$ SD	2,07 $\pm$ 0,08	2,08 $\pm$ 0,14	2,13 $\pm$ 0,10	2,18 $\pm$ 0,11
3 mgCd/L	L1	5,10	6,13	15,05	21,95
	L2	5,25	5,80	15,66	22,44
	L3	5,37	5,90	15,90	22,63
	Mean $\pm$ SD	5,24 $\pm$ 0,14	5,94 $\pm$ 0,17	15,54 $\pm$ 0,44	22,34 $\pm$ 0,35
5 mgCd/L	L1	12,28	13,19	17,42	21,86
	L2	11,90	13,78	18,13	22,46
	L3	12,67	13,38	18,30	21,52
	Mean $\pm$ SD	12,28 $\pm$ 0,39	13,45 $\pm$ 0,30	17,95 $\pm$ 0,47	21,95 $\pm$ 0,48
10 mgCd/L	L1	19,73	25,90	30,53	30,70
	L2	20,42	26,64	30,82	31,82
	L3	20,07	26,15	31,44	30,45
	Mean $\pm$ SD	20,07 $\pm$ 0,35	26,23 $\pm$ 0,38	30,93 $\pm$ 0,46	30,99 $\pm$ 0,73

Phụ lục 35. Hàm lượng Cd tích lũy tại gan cá rô đồng trong 28 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Tổng lượng Cd tích lũy tại gan cá (mg/kg gan khô)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	0,33	0,34	0,33	0,43
	L2	0,38	0,36	0,40	0,32
	L3	0,37	0,33	0,38	0,34
	Mean $\pm$ SD	0,36 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,06
3 mgCd/L	L1	201,57	286,20	312,82	375,51
	L2	215,22	277,10	324,67	370,43
	L3	209,73	280,15	320,73	362,87
	Mean $\pm$ SD	208,84 $\pm$ 6,87	281,15 $\pm$ 4,63	319,41 $\pm$ 6,03	369,60 $\pm$ 6,36
5 mgCd/L	L1	397,54	570,23	628,53	783,16
	L2	410,12	564,90	638,79	773,32
	L3	400,67	560,33	634,51	771,33
	Mean $\pm$ SD	402,78 $\pm$ 6,55	565,15 $\pm$ 4,95	633,94 $\pm$ 5,15	775,94 $\pm$ 6,33
10 mgCd/L	L1	540,00	698,43	1071,25	1595,39
	L2	530,15	703,24	1084,66	1582,10
	L3	532,19	690,65	1075,33	1580,80
	Mean $\pm$ SD	534,11 $\pm$ 5,20	697,44 $\pm$ 6,35	1077,08 $\pm$ 6,87	1586,10 $\pm$ 8,07

Phụ lục 36. Hàm lượng Cd tích lũy tại thịt cá rô đồng trong 28 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ Độ lệch chuẩn, n = 3)

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Tổng lượng Cd tích lũy tại thịt cá (mg/kg thịt khô)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	0,03	0,03	0,02	0,03
	L2	0,03	0,03	0,03	0,03
	L3	0,03	0,03	0,03	0,03
	Mean $\pm$ SD	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00
3 mgCd/L	L1	0,55	1,05	1,39	1,49
	L2	0,61	0,94	1,54	1,58
	L3	0,64	1,01	1,48	1,47
	Mean $\pm$ SD	0,60 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,06	1,47 $\pm$ 0,08	1,51 $\pm$ 0,06
5 mgCd/L	L1	1,76	1,94	2,52	5,44
	L2	1,85	2,08	2,61	5,62
	L3	1,80	2,21	2,67	5,39
	Mean $\pm$ SD	1,80 $\pm$ 0,05	2,08 $\pm$ 0,14	2,60 $\pm$ 0,08	5,48 $\pm$ 0,12
10 mgCd/L	L1	3,57	4,13	5,51	7,56
	L2	3,28	4,21	5,30	7,81
	L3	3,32	4,40	5,40	7,70
	Mean $\pm$ SD	3,39 $\pm$ 0,16	4,25 $\pm$ 0,14	5,40 $\pm$ 0,11	7,69 $\pm$ 0,13

Phụ lục 37. Hàm lượng cortisol trong huyết tương cá rô đồng sau 28 ngày sống trong môi trường ô nhiễm Cd

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Lượng cortisol trong huyết tương (ng/mL)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	33,06	33,14	33,37	33,23
	L2	34,23	34,27	34,42	34,13
	L3	33,92	33,55	34,21	33,40
	Mean $\pm$ SD	33,74 $\pm$ 0,61	33,65 $\pm$ 0,57	34,00 $\pm$ 0,56	33,59 $\pm$ 0,48
3 mgCd/L	L1	72,95	54,31	59,21	65,89
	L2	70,93	52,62	57,47	64,40
	L3	71,76	53,15	58,34	65,00
	Mean $\pm$ SD	71,88 $\pm$ 1,02	53,36 $\pm$ 0,86	58,34 $\pm$ 0,87	65,10 $\pm$ 0,75
5 mgCd/L	L1	89,10	69,34	60,23	68,90
	L2	87,67	67,78	58,88	66,89
	L3	88,00	68,93	59,47	68,07
	Mean $\pm$ SD	88,26 $\pm$ 0,75	68,68 $\pm$ 0,81	59,53 $\pm$ 0,68	67,95 $\pm$ 1,01
10 mgCd/L	L1	94,43	103,05	101,32	103,77
	L2	95,05	105,14	103,67	104,72
	L3	96,09	104,07	102,27	105,86
	Mean $\pm$ SD	95,19 $\pm$ 0,84	104,09 $\pm$ 1,05	102,42 $\pm$ 1,18	104,78 $\pm$ 1,05

Phụ lục 38. Hàm lượng insulin trong máu cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm Cd

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Lượng insulin trong máu (ng/mL)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	24,71	24,65	23,13	24,32
	L2	23,32	23,67	24,81	23,71
	L3	23,67	23,23	23,06	24,00
	Mean $\pm$ SD	23,90 $\pm$ 0,72	23,85 $\pm$ 0,73	23,67 $\pm$ 0,99	24,01 $\pm$ 0,31
3 mgCd/L	L1	7,17	3,36	1,97	1,23
	L2	7,23	2,45	1,50	1,25
	L3	7,80	2,88	1,30	1,68
	Mean $\pm$ SD	7,40 $\pm$ 0,35	2,90 $\pm$ 0,46	1,59 $\pm$ 0,34	1,39 $\pm$ 0,25
5 mgCd/L	L1	5,05	1,88	1,33	1,40
	L2	4,34	1,82	1,16	1,16
	L3	4,29	2,26	1,11	1,01
	Mean $\pm$ SD	4,56 $\pm$ 0,43	1,99 $\pm$ 0,24	1,20 $\pm$ 0,12	1,19 $\pm$ 0,20
10 mgCd/L	L1	2,32	1,15	0,93	0,97
	L2	2,20	1,43	1,15	0,92
	L3	2,85	0,96	1,24	1,16
	Mean $\pm$ SD	2,46 $\pm$ 0,35	1,18 $\pm$ 0,24	1,11 $\pm$ 0,16	1,02 $\pm$ 0,13

Phụ lục 39. Hàm lượng glycogen trong gan cá rô đồng sau 28 ngày phơi nhiễm Cd

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Lượng glycogen (mg/g)</i>			
		<i>Ngày thứ 7</i>	<i>Ngày thứ 14</i>	<i>Ngày thứ 21</i>	<i>Ngày thứ 28</i>
Đối chứng	L1	90,88	90,92	90,15	90,68
	L2	90,00	90,15	89,80	89,90
	L3	91,05	91,00	90,32	90,40
	Mean $\pm$ SD	90,64 $\pm$ 0,56	90,69 $\pm$ 0,47	90,09 $\pm$ 0,27	90,33 $\pm$ 0,40
3 mgCd/L	L1	43,41	36,32	32,67	27,95
	L2	45,11	35,90	31,48	28,22
	L3	45,96	37,73	30,90	27,00
	Mean $\pm$ SD	44,83 $\pm$ 1,30	36,65 $\pm$ 0,96	31,68 $\pm$ 0,90	27,72 $\pm$ 0,64
5 mgCd/L	L1	36,72	31,45	27,88	16,82
	L2	35,90	30,98	26,21	17,19
	L3	35,23	31,90	27,00	15,73
	Mean $\pm$ SD	35,95 $\pm$ 0,75	31,44 $\pm$ 0,46	27,03 $\pm$ 0,84	16,58 $\pm$ 0,76
10 mgCd/L	L1	28,64	23,44	20,18	17,75
	L2	27,85	22,12	18,63	15,70
	L3	26,07	21,78	19,00	16,09
	Mean $\pm$ SD	27,52 $\pm$ 1,32	22,45 $\pm$ 0,88	19,27 $\pm$ 0,81	16,51 $\pm$ 1,09

Phụ lục 40: Chiều dài và trọng lượng của cá rô đồng sau 14 ngày phơi nhiễm (Giá trị chính $\pm$ độ lệch chuẩn, n = 3)

Thí nghiệm	Kích thước của cá rô đồng (cm)			Trọng lượng của cá rô đồng (g)		
	<i>Ngày đầu tiên bắt đầu phơi nhiễm</i>	<i>Ngày thứ 28 (phơi nhiễm)</i>	<i>Sau 14 ngày phơi nhiễm</i>	<i>Ngày đầu tiên bắt đầu phơi nhiễm</i>	<i>Ngày thứ 28 (phơi nhiễm)</i>	<i>Sau 14 ngày phơi nhiễm</i>
Đối chứng	$8,90 \pm 0,40$	$9,60 \pm 0,30$ ($\uparrow 8,20\%$) ^a	$10,90 \pm 0,30$ ($\uparrow 22,50\%$) ^a ($\uparrow 13,20\%$) ^b	$14,52 \pm 0,28$	$15,89 \pm 0,49$ ($\uparrow 9,44\%$) ^a	$17,17 \pm 0,35$ ($\uparrow 18,25\%$) ^b ($\uparrow 8,06\%$) ^c
3Cd	$9,10 \pm 0,20$	$9,50 \pm 0,40$ ($\uparrow 5,30\%$) ^a	$10,20 \pm 0,40$ ($\uparrow 12,50\%$) ^a ($\uparrow 6,80\%$) ^b	$12,36 \pm 0,41$	$13,11 \pm 0,57$ ($\uparrow 6,07\%$) ^a	$14,20 \pm 0,48$ ($\uparrow 13,98\%$) ^a ($\uparrow 8,31\%$) ^b
5Cd	$9,10 \pm 0,30$	$9,50 \pm 0,40$ ($\uparrow 3,60\%$) ^a	$9,90 \pm 0,40$ ($\uparrow 7,90\%$) ^a ($\uparrow 4,10\%$) ^b	$12,32 \pm 0,50$	$13,00 \pm 0,65$ ($\uparrow 5,49\%$) ^a	$13,56 \pm 0,45$ ($\uparrow 10,03\%$) ^a ($\uparrow 4,31\%$) ^b
10Cd	$9,30 \pm 0,30$	$9,60 \pm 0,50$ ($\uparrow 3,00\%$) ^a	$9,80 \pm 0,50$ ($\uparrow 5,50\%$) ^a ($\uparrow 2,40\%$) ^b	$12,24 \pm 0,46$	$12,08 \pm 0,52$ ($\uparrow 4,58\%$) ^a	$13,05 \pm 0,46$ ($\uparrow 6,62\%$) ^a ($\uparrow 1,95\%$) ^b

^a: Tăng so với ngày bắt đầu phơi nhiễm Cd;^b: Tăng so với ngày thứ 28 của giai đoạn phơi nhiễm.

Phụ lục 41. Hàm lượng Cd còn trong các mô của cá rô đồng sau 14 ngày thôi nhiễm

<i>Thí nghiệm</i>		<i>Hàm lượng Cd còn trong mô cá (mg/kg)</i>		
		<i>Mang cá</i>	<i>Gan cá</i>	<i>Thịt cá</i>
Sau 28 ngày phơi nhiễm				
3 mgCd/L	L1	21,95	375,51	1,49
	L2	22,44	370,43	1,58
	L3	22,63	362,87	1,47
	Mean $\pm$ SD	22,34 $\pm$ 0,35	369,60 $\pm$ 6,36	1,51 $\pm$ 0,06
5 mgCd/L	L1	21,86	783,16	5,44
	L2	22,46	773,32	5,62
	L3	21,52	771,33	5,39
	Mean $\pm$ SD	21,95 $\pm$ 0,48	775,94 $\pm$ 6,33	5,48 $\pm$ 0,12
10 mgCd/L	L1	30,70	1595,39	7,56
	L2	31,82	1582,10	7,81
	L3	30,45	1580,80	7,70
	Mean $\pm$ SD	30,99 $\pm$ 0,73	1586,10 $\pm$ 8,07	7,69 $\pm$ 0,13
Sau 14 ngày thôi nhiễm				
3 mgCd/L	L1	13,64	284,69	1,15
	L2	13,26	287,67	1,14
	L3	13,28	292,01	1,03
	Mean $\pm$ SD	13,39 $\pm$ 0,21	288,12 $\pm$ 3,68	1,11 $\pm$ 0,07
5 mgCd/L	L1	14,01	674,70	3,94
	L2	14,57	681,68	3,70
	L3	14,38	678,08	3,96
	Mean $\pm$ SD	14,32 $\pm$ 0,28	678,15 $\pm$ 3,49	3,87 $\pm$ 0,14
10 mgCd/L	L1	22,35	1416,51	5,10
	L2	22,64	1406,87	5,48
	L3	21,96	1414,93	5,67
	Mean $\pm$ SD	22,32 $\pm$ 0,34	1412,77 $\pm$ 5,17	5,42 $\pm$ 0,29