

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA KẼM LÊN SỰ SỐNG CÁ NGỰA VẪN GIAI ĐOẠN ẤU TRÙNG (1 - 7 ngày tuổi)

NGUYỄN THỊ THƯƠNG HUYỀN*, ĐOÀN LÊ MINH HIỀN**

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ kẽm lên sự sống của ấu trùng cá Ngựa vằn (1-7 ngày tuổi). Phôi cá Ngựa vằn mới thụ tinh cho tiếp xúc với dung dịch muối kẽm ở 10 nồng độ khác nhau (1-10 mg/L) và lô đối chứng (0 mg/L) trong môi trường nước máy. Sau khi nở, ấu trùng được nuôi trong môi trường có các nồng độ Zn tương ứng. Kết quả cho thấy: (i) nồng độ 1 mg/L là ngưỡng ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của ấu trùng; (ii) đã lập được phương trình tiên đoán tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn theo ảnh hưởng tương tác của nồng độ Zn và thời gian nuôi, xác định được giá trị LC_{50} gây chết 50% ấu trùng từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7; (iii) Nhịp tim và kích thước ấu trùng cá Ngựa vằn giảm tuyến tính theo sự gia tăng của nồng độ Zn khảo sát và thời gian nuôi.

Từ khóa: cá Ngựa vằn, ô nhiễm kẽm, nhịp tim, ấu trùng cá Ngựa vằn, kim loại nặng.

ABSTRACT

Evaluating the influences of zinc (Zn) on the life of larval zebrafish (1-7 days old)

The aim of this study is to evaluate the influences of concentrations of Zn on the life of zebrafish larvae (1-7 days old). After spawning, embryos were exposed to Zn in the examined concentrations: 1-10 mg/L and control (0 mg/L) in water medium. After hatching, larvae were transferred to water medium supplemented examined concentrations of Zn, respectively. The results show: (i) the minimal concentration of Zn affected the survival rate of larval zebrafish is 1 mg/L; (ii) an equation was established to predict the survival rate of zebrafish larvae following interaction between concentrations of Zn and culture time, can calculate LC_{50} of Zn to the larval zebrafish stage (1-7 days); (iii) With the increasing of examined Zn concentrations and time, the heartbeat and the body length decreased linearly.

Keywords: zebrafish, larval zebrafish, zinc pollution, heartbeat, heavy metal.

1. Giới thiệu

Ô nhiễm môi trường gây nhiều ảnh hưởng nguy hại cho sức khỏe con người cũng như các sinh vật khác, trong đó ô nhiễm kim loại nặng ở môi trường nước gây hại nhất, mà tiêu biểu là ô nhiễm cadmium, asen, chì, kẽm... Đặc biệt, kim loại nặng có thể thâm nhập và tích tụ trong cơ thể người và sinh vật một cách trực tiếp hay gián tiếp qua chuỗi thức ăn và gây ngộ độc, gây bệnh (viêm và sưng ống thực quản, thần kinh co giật, thay đổi huyết áp...). [2]

* TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM; Email: huyenntth@hcmup.edu.vn

** HVCH, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

Trong các kim loại, kẽm là một nguyên tố vi lượng thiết yếu cho đời sống của cả thực vật, động vật và con người. Zn được tìm thấy trong khắp các tế bào của cơ thể, kim loại này tham gia vào cấu tạo của hơn 200 loại enzyme trong cơ thể người, góp phần điều hòa chuyển hóa lipid, tham gia tạo máu cùng với sắt, cần thiết cho sự biệt hóa tế bào, giúp ổn định cấu trúc màng tế bào, tham gia vào chức năng của hệ miễn dịch... Thiếu Zn sẽ gây ra các triệu chứng như: chán ăn, chậm tăng trưởng, suy giảm hệ miễn dịch, thiếu năng sinh dục, rụng tóc và lông, suy giảm vị giác và khứu giác... Tuy nhiên, khi cơ thể thừa Zn hoặc nồng độ Zn cao trong môi trường sống cũng gây hại cho các sinh vật ở những nơi bị ô nhiễm [10]. Do đó, việc nghiên cứu mức độ ảnh hưởng của Zn lên sự sinh trưởng và phát triển của cơ thể sinh vật là vô cùng cấp thiết.

Từ những năm 1970, cá Ngựa vằn đã được nhà khoa học George Streisinger đưa vào phục vụ cho nghiên cứu khoa học. Đây là đối tượng được sử dụng nhiều trong các thí nghiệm vì chúng có những ưu điểm như: kích thước nhỏ, khả năng sinh sản lớn, thụ tinh ngoài, phôi lớn và trong suốt, phát triển nhanh, dễ nuôi [9, 10]. Trong các giai đoạn phát triển của cá Ngựa vằn, giai đoạn phôi và ấu trùng có thời gian phát triển nhanh nhất và độ nhạy cảm cao nhất. Chỉ với một nồng độ nhỏ hóa chất tác động lên giai đoạn này, ta cũng dễ dàng nhận thấy được sự thay đổi ở chúng. Vì thế, phôi và ấu trùng là một giai đoạn khá dễ được lựa chọn để thực hiện nghiên cứu. Nghiên cứu này sử dụng phôi cá Ngựa vằn để đánh giá ảnh hưởng của Zn lên sự sống của giai đoạn ấu trùng (1-7 ngày tuổi).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

Hóa chất gây nhiễm độc cá: $ZnCl_2$ (Sigma); hóa chất để chuẩn pH: NaOH 1N (Merck), HCl 1N (Merck).

Dung dịch stock Zn được pha ra nồng độ 1 g/L bằng cách hòa tan 0,2086g muối $ZnCl_2$ trong 100mL nước cất. Dung dịch sau khi pha được đựng trong chai Duran sạch. Sử dụng stock này để pha ra các nồng độ thí nghiệm (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/L).

Nước nuôi cá dùng cho toàn bộ thí nghiệm là nước máy được để bay hơi, khử sạch clo trước khi sử dụng.

2.2. Vật liệu

Phôi cá ở giai đoạn phôi nang (sau 3 giờ thụ tinh - 3 hpf), phôi vị (5 hpf).

2.3. Phương pháp

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Giải phẫu - Sinh lí Người và Động vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm TPHCM. Cá Ngựa vằn bố mẹ được nuôi ổn định điều kiện sống theo chu kỳ quang 14 giờ sáng:10 giờ tối tại phòng thí nghiệm.

- *Phương pháp phối cá và thu phôi*

Tạo một vách ngăn giữa bể phối để tách riêng cá đực và cá cái theo tỉ lệ 1: 2. Tạo chu kỳ quang cho cá. Tháo vách ngăn để cá phối với nhau [11]. Sau 3 - 5 phút cho phối, toàn bộ phôi được thu sang cốc thủy tinh 1000mL và tiến hành phân loại phôi. Các

phôi tốt được thu nhận vào các đĩa petri thủy tinh sạch có đường kính 35mm để nuôi phôi. [11]

- *Phương pháp gây nhiễm Zn cho ấu trùng*

Lựa chọn các phôi tốt phục vụ cho thí nghiệm. Tất cả các phôi thí nghiệm đều được nuôi ở nhiệt độ 28 °C, pH = 7,5 (Westerfield, 2007). Phôi được tiếp xúc với môi trường chứa Zn ở các nồng độ (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10 mg/L) và lô đối chứng (0mg/L). Mỗi nghiệm thức có 30 phôi (lặp lại 5 lần) được để trong đĩa thủy tinh có đường kính 60mm, đặt toàn bộ đĩa này vào cốc thủy tinh chứa 300ml môi trường với các nồng độ Zn khảo sát. Sau khi nở, ấu trùng cá Ngựa vằn được tiếp tục gây nhiễm Zn với các nồng độ tương ứng để khảo sát tỉ lệ sống, nhịp tim, chiều dài từ ngày thứ 1 - đến ngày thứ 7.

- *Đánh giá sức sống của ấu trùng*

Thống kê tỉ lệ sống chết và ghi nhận các dị tật của ấu trùng ở từng nồng độ, khoảng cách giữa các lần ghi nhận sau mỗi 24 giờ (ấu trùng từ ngày 1 đến ngày 7).

- *Phương pháp đếm nhịp tim*

Ấu trùng được hút bằng ống hút nhựa mềm với đường kính 1mm. Sau đó, cho vào đĩa petri đường kính 60mm có chứa đủ môi trường tương ứng để ấu trùng có thể sống được. Đưa mẫu lên kính hiển vi đảo ngược, đặt dưới vật kính X10, sử dụng máy ảnh Canon quay phim nhịp tim ấu trùng trong 1 phút. Chọn ngẫu nhiên 6 ấu trùng trong tổng số ấu trùng sống qua từng ngày, từ ngày 1 đến ngày 7. Thí nghiệm lặp lại 5 lần.

- *Phương pháp đo kích thước ấu trùng*

Ấu trùng được đo kích thước qua từng ngày (từ ngày 1 đến ngày 7). Chọn ngẫu nhiên 6 ấu trùng trong tổng số ấu trùng sống, thí nghiệm lặp lại 5 lần.

Ấu trùng được hút bằng ống hút nhựa mềm, đường kính 1mm. Sau đó cho vào đĩa petri đường kính 60mm có chứa đủ môi trường tương ứng để ấu trùng sống có thể sống được. Đưa mẫu lên kính hiển vi soi nổi có gắn trục vi thị kính, đặt ở bộ giác X1 và chụp hình lại.

Yêu cầu: Hình cần rõ thước đo, ấu trùng thẳng, nhìn rõ toàn bộ cơ thể, đặc biệt là phần đầu và vây đuôi (Hình 1).



Hình 1. Chiều dài cơ thể ấu trùng cá Ngựa vằn (X2)

Cách đo chiều dài: chiều dài của ấu trùng được tính từ phần miệng đến phần đuôi (kết thúc xương, cơ). Vây đuôi không được tính vào kích thước ấu trùng.

Phương pháp quy đổi kích thước ấu trùng: kích thước của ấu trùng sau khi được đo bằng thước đo của kính hiển vi sẽ được quy đổi sang đơn vị mm bằng công thức sau:

$$L = \frac{1}{10} \times \frac{A}{B}$$

trong đó:

- L: chiều dài cơ thể cá (mm);
- A: số vạch đo được từ thước đo của kính hiển vi soi nổi;
- B: bội giác vật kính.

• *Phương pháp xử lý thống kê*

Tất cả số liệu của đề tài được xử lý theo các thuật toán xác suất thống kê trên máy vi tính bằng phần mềm Minitab 16, SPSS 20. Các số liệu trung bình được trình bày ở dạng $\bar{x} \pm SE$. Xử lý sai khác về tỉ lệ sống chết ấu trùng, nhịp tim và chiều dài ấu trùng bằng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố: ANOVA - One Way.

Để phân tích mối liên hệ giữa tỉ lệ sống của ấu trùng với các yếu tố nồng độ Zn và thời gian, chúng tôi áp dụng phương pháp phân tích hồi quy logistic (logistic regression analysis method) với mô hình hồi quy được sử dụng là Poisson regression model được phát biểu dưới dạng: $\log\left(\frac{\mu_i}{N_i}\right) = \alpha + \beta x_i$

Khi đó thông số (parameter) α và β trong mô hình được ước tính (estimation) theo phương pháp hợp lý cực đại (maximum likelihood-based method).

$$\begin{cases} \sum_{i=1}^n y_i = \sum_{i=1}^n (e^{(\hat{\alpha} + \hat{\beta}x_i)}) \\ \sum_{i=1}^n x_i y_i = \sum_{i=1}^n x_i (e^{(\hat{\alpha} + \hat{\beta}x_i)}) \end{cases}$$

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của Zn lên tỉ lệ sống của ấu trùng

Cá con giai đoạn ấu trùng có tính nhạy cảm cao nhất trong vòng đời cá, đặc biệt là ấu trùng trong tuần đầu tiên sau khi nở [4, 5, 6]. Do đó, sức sống của ấu trùng cá Ngựa vằn từ 1 - 7 ngày tuổi được theo dõi và ghi nhận sau mỗi 24 giờ để đánh giá độ nhạy cảm với Zn gây nhiễm. Kết quả tỉ lệ sống của cá ấu trùng trong giai đoạn 7 ngày tuổi đầu tiên được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn qua các mốc thời gian ở các nồng độ khảo sát

Ngày	Nồng độ Zn (mg/L)										
	ĐC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	89,33	75,33	70,00	66,00	58,67	54,00	44,67	43,33	37,33	29,33	26,67
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,52	3,52	3,74	3,87	4,02	4,07	4,06	4,05	3,95	3,72	3,61
	(134)	(113)	(105)	(99)	(88)	(81)	(67)	(65)	(56)	(44)	(40)
2	88,67	74,67	69,33	63,33	55,33	47,33	30,00	24,00	15,33	8,67	8,67
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,59	3,55	3,76	3,93	4,06	4,08	3,74	3,49	2,94	2,30	2,30
	(133)	(112)	(104)	(95)	(83)	(71)	(45)	(36)	(23)	(13)	(13)
3	88,00	74,67	69,33	60,00	52,00	42,00	27,33	20,67	10,00	4,67	0,00
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,65	3,55	3,76	4,00	4,08	4,03	3,64	3,31	2,45	1,72	0,00
	(132)	(112)	(104)	(90)	(78)	(63)	(41)	(31)	(15)	(7)	(0)
4	84,00	74,67	68,00	60,00	47,33	39,33	24,67	15,33	4,67	1,33	0,00
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,99	3,55	3,81	4,00	4,08	3,99	3,52	2,94	1,72	0,94	0,00
	(126)	(112)	(102)	(90)	(71)	(59)	(37)	(23)	(7)	(2)	(0)
5	81,33	74,67	67,33	57,33	44,67	34,67	16,67	12,00	4,00	0,67	0,00
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	3,18	3,55	3,83	4,04	4,06	3,89	3,04	2,65	1,60	0,66	0,00
	(122)	(112)	(101)	(86)	(67)	(52)	(25)	(18)	(6)	(1)	(0)
6	77,33	66,00	62,00	50,67	39,33	27,33	10,67	8,00	0,67	0,00	0,00
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	3,42	3,87	3,96	4,08	3,99	3,64	2,52	2,22	0,66	0,00	0,00
	(116)	(99)	(93)	(76)	(59)	(41)	(16)	(12)	(1)	(0)	(0)
7	65,33	54,67	52,00	34,67	28,67	20,67	4,00	3,33	0,00	0,00	0,00
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	3,89	4,06	4,08	3,89	3,69	3,31	1,60	1,47	0,00	0,00	0,00
	(98)	(82)	(78)	(52)	(43)	(31)	(6)	(5)	(0)	(0)	(0)

Qua Bảng 1, ta nhận thấy tỷ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn giảm tuyến tính theo sự tăng dần của nồng độ Zn trong môi trường qua các ngày nuôi, sự giảm này có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy cao ($p = 0,00$). Từ kết quả này, tiến hành đánh giá các yếu tố thời gian nuôi và nồng độ Zn lên tỷ lệ sống của ấu trùng.

3.1.1. Khảo sát sự biến động tỉ lệ sống của ấu trùng qua các ngày nuôi trong môi trường có Zn ở các nồng độ khảo sát

Từ kết quả Bảng 1, chúng tôi tiến hành đánh giá sự biến động tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn qua các ngày nuôi trong các môi trường có chứa các nồng độ Zn khảo sát. Kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến tỉ lệ sống của ấu trùng cá ở các nồng độ Zn

Nồng độ Zn (mg/L)	Yếu tố tiên đoán (predictor)	Hệ số ước lượng	p	Risk Ratio	95% CI
ĐC	Hằng số α	-0,026	0,729	0,957	0,925 - 0,989
	Ngày - β	-0,044	0,010		
1	Hằng số α	-0,190	0,017	0,961	0,927 - 0,996
	Ngày - β	-0,040	0,029		
2	Hằng số α	-0,273	0,001	0,962	0,927 - 0,999
	Ngày - β	-0,039	0,043		
3	Hằng số α	-0,279	0,001	0,925	0,888 - 0,963
	Ngày - β	-0,078	0,000		
4	Hằng số α	-0,384	0,000	0,905	0,865 - 0,946
	Ngày - β	-0,100	0,000		
5	Hằng số α	-0,445	0,000	0,868	0,826 - 0,913
	Ngày - β	-0,141	0,000		
6	Hằng số α	-0,493	0,000	0,749	0,698 - 0,803
	Ngày - β	-0,290	0,000		
7	Hằng số α	-0,549	0,000	0,706	0,651 - 0,766
	Ngày - β	-0,348	0,000		
8	Hằng số α	-0,331	0,060	0,503	0,434 - 0,583
	Ngày - β	-0,688	0,000		
9	Hằng số α	-0,221	0,360	0,358	0,275 - 0,465
	Ngày - β	-1,027	0,000		
10	Hằng số α	0,365	0,282	0,197	0,121 - 0,321
	Ngày - β	-1,624	0,000		

Qua Bảng 2 cho thấy, trong môi trường không có Zn (lô đối chứng), tỉ lệ sống của ấu trùng có sự khác biệt qua các ngày nuôi, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p = 0,01$). Với $\beta = -0,044 < 0$ cho thấy tỉ lệ sống của ấu trùng giảm dần qua các ngày nuôi. Cụ thể, qua mỗi ngày nuôi tỉ lệ sống của ấu trùng giảm đi $e^{-0,044} = 0,957$ lần. Tuy nhiên, sự biến động này là do ngẫu nhiên. Điều này có thể do: khi chuyển từ giai đoạn phôi

sang giai đoạn ấu trùng, cá bị ảnh hưởng trực tiếp bởi môi trường xung quanh (ánh sáng, tiếng ồn, nồng độ oxi hòa tan) do không còn lớp màng đệm bảo vệ; lúc này ấu trùng sống chủ yếu dựa vào chất dinh dưỡng từ túi noãn hoàng cho đến khi lấy được thức ăn bên ngoài. Tuy nhiên, khi cá khoảng 5 - 6 ngày tuổi, túi noãn hoàng đã dần tiêu biến nhiều và đến 7 ngày tuổi thì túi noãn hoàng hoàn toàn biến mất, lúc này cá con phải tự tìm nguồn dinh dưỡng bên ngoài [7]. Trong các giai đoạn sống của cá, giai đoạn ấu trùng thường nhạy cảm hơn cá trưởng thành, giai đoạn ấu trùng mới nở là một giai đoạn sống đặc biệt nhạy cảm và dễ bị tổn thương. [3]

Tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn trong các môi trường chứa hàm lượng Zn có sự giảm dần qua các ngày nuôi theo sự tăng dần của nồng độ Zn khảo sát. Ngay tại nồng độ 1 mg/L, tỉ lệ sống của ấu trùng có sự khác biệt có ý nghĩa qua các ngày nuôi ($p=0,029$). Qua mỗi ngày nuôi, tỉ lệ sống của ấu trùng giảm đi $e^{-0,040} = 0,961$ lần. Tại các nồng độ Zn từ 2 - 10 mg/L cũng cho kết quả tương tự. Điều này có nghĩa là, tại ngưỡng nồng độ từ 1 mg/L trở lên, Zn đã bắt đầu gây ảnh hưởng đến tỉ lệ sống - chết của ấu trùng cá Ngựa vằn.

3.1.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ Zn đến tỉ lệ sống của ấu trùng qua từng ngày nuôi

Từ kết quả Bảng 1, chúng tôi cố định từng mốc thời gian qua mỗi ngày (7 mốc, từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7) và tiến hành đánh giá sự biến động tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn theo sự tăng dần nồng độ Zn. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ Zn đến tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn tại các mốc thời gian

Thời gian	Yếu tố tiên đoán (predictor)	Hệ số ước lượng	p	Risk Ratio	95% CI
Ngày 1	Hằng số α	-0,113	0,037	0,893	0,874 - 0,913
	Nồng độ - β	-0,113	0,000		
Ngày 2	Hằng số α	0,014	0,802	0,812	0,791 - 0,834
	Nồng độ - β	-0,208	0,000		
Ngày 3	Hằng số α	0,059	0,289	0,779	0,757 - 0,801
	Nồng độ - β	-0,250	0,000		
Ngày 4	Hằng số α	0,065	0,247	0,757	0,735 - 0,781
	Nồng độ - β	-0,278	0,000		
Ngày 5	Hằng số α	0,060	0,296	0,740	0,716 - 0,764
	Nồng độ - β	-0,301	0,000		
Ngày 6	Hằng số α	4,706E ⁻⁰⁰⁵	0,999	0,715	0,689 - 0,741
	Nồng độ - β	-0,336	0,000		
Ngày 7	Hằng số α	-0,173	0,011	0,686	0,656 - 0,717
	Nồng độ - β	-0,377	0,000		

Ngay từ ngày thứ 1, tỉ lệ sống của ấu trùng từ nồng độ 6 - 10 mg/L đều nằm dưới ngưỡng 50% (Bảng 1), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,00$). Cụ thể, cứ tăng 1 mg/L Zn thì tỉ lệ sống của ấu trùng giảm đi $e^{-0,113} = 0,893$ lần. Khi xử lí và phân tích kết quả ở Bảng 3 tại các ngày từ thứ 2 đến thứ 7 cũng cho kết quả tương tự ngày thứ 1. Vì vậy, có thể kết luận sức sống của ấu trùng cá Ngựa vằn vào ngày thứ 1 sau khi nở có mức độ nhạy cảm cao nhất với Zn. Điều này có thể do khi còn ở giai đoạn phôi, cá được bảo vệ trong lớp màng đệm nên hạn chế được sự xâm nhập của Zn ngoài môi trường vào bên trong phôi. Tuy nhiên, sau khi cá nở, Zn trong môi trường nuôi sẽ tác động trực tiếp trên cơ thể cá, gây chết khi ở nồng độ càng cao. Nghiên cứu của Hwang và cs. (1995) đã khẳng định mức độ nhạy cảm đối với Zn ở giai đoạn ấu trùng có thể có liên quan tới sự phát triển của ấu trùng, đồng thời tính thấm của màng tế bào đối với các ion hoặc cơ chế cân bằng ion cũng có thể bị thay đổi trong quá trình phát triển của ấu trùng. Ở giai đoạn ấu trùng, có thể khi có sự thay đổi nồng độ gây nhiễm Zn sẽ làm thay đổi mức độ nhạy cảm với Zn [4, 5, 6].

Ngoài ra, môi trường nuôi cá với các yếu tố sinh thái (ánh sáng, tiếng ồn, nồng độ O_2 và CO_2 hòa tan) chưa được điều chỉnh tối ưu cũng có thể là một trong những tác nhân gây stress cho cá. Kết quả của chúng tôi phù hợp với công bố của Hwang và cs. (1995) [6], họ cho rằng ấu trùng có tính nhạy cảm cao nhất trong vòng đời cá, sự nhạy cảm của ấu trùng lúc mới nở tăng lên dưới sự bất lợi của môi trường ô nhiễm kim loại như Zn.

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của hai yếu tố thời gian và nồng độ Zn đến tỉ lệ sống của ấu trùng

Từ kết quả Bảng 1, chúng tôi đánh giá sự biến động tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn theo sự ảnh hưởng tương tác của hai yếu tố thời gian và nồng độ Zn theo mô hình hồi quy Poission (Poission regression) được phát biểu như sau:

$$\text{Log}(\mu_i/N_i) \sim (\text{Thời gian} + \text{Nồng độ})$$

$$\text{Hoặc: } \text{Log}(\mu_i/N_i) = \alpha + \beta_1 * \text{Ngày} + \beta_2 * \text{Nồng độ} + \beta_3 * \text{Ngày} * \text{Nồng độ}$$

Kết quả thể hiện qua Bảng 4.

Tiên đoán giá trị LC_{50} ở ngày 1

Bảng 4. Ảnh hưởng tương tác của thời gian và nồng độ Zn đến tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn

Yếu tố tiên đoán (predictor)	Hệ số ước lượng	p	Risk Ratio	95% CI
Hằng số α (constant)	-0,113	0,037	0,893	0,802 - 0,993
Ngày - β_1	0,000		1,000	
Nồng độ - β_2	-0,113	0,000	0,893	0,874 - 0,913
Tương tác - β_3	0,000		1,000	

Từ kết quả ở Bảng 4, chúng tôi thiết lập phương trình tiên đoán tỉ lệ sống của ấu trùng (Pr) theo sự ảnh hưởng của các yếu tố như sau:

$$Pr = \exp(\alpha + \beta_1 * \text{Thời gian} + \beta_2 * \text{Nồng độ} + \beta_3 * \text{Nồng độ} * \text{Thời gian})$$

Với $\alpha = -0,113$; $\beta_1 = 0,000$; $\beta_2 = -0,113$; $\beta_3 = 0,000$. Thế vào ta được phương trình tiên đoán tỉ lệ sống như sau:

$$Pr = \exp(-0,113 - 0,113 * \text{Nồng độ})$$

Dựa vào mô hình trên ta có thể tính toán được ngưỡng nồng độ Zn gây chết 50% đối với ấu trùng cá Ngựa vằn (là ngưỡng nồng độ Zn mà tại đó tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn giảm đi 50%) như sau:

Tỉ lệ sống ước tính tại ngày 1 trong môi trường không có Zn là:

$$Pr(0) (\text{Thời gian} = 1, \text{Zn} = 0) = \exp(-0,113) = 0,893$$

Tỉ lệ sống ước tính tại ngày 1 trong môi trường có ion Zn là:

$$Pr(X) (\text{Thời gian} = 1, \text{Zn} = X) = \exp(-0,113 - 0,113 * X)$$

Tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn giảm đi 50% nghĩa là $Pr(X)/Pr(0) = 1/2 = 0,5$

$$\text{Như vậy: } Pr(X)/Pr(0) = 0,5 \rightarrow \exp(-0,113 - 0,113 * X) / 0,893 = 0,5$$

$$\rightarrow \exp(-0,113 - 0,113 * X) = 0,447 \rightarrow -0,113 - 0,113 * X = \ln(0,447)$$

$$\rightarrow X = \mathbf{6,12 \text{ mg/L Zn}}$$

Tương tự, chúng tôi tính toán được ngưỡng nồng độ Zn gây chết 50% đối với ấu trùng cá Ngựa vằn ở ngày 2 đến ngày 7. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5

Bảng 5. Giá trị LC₅₀ của ấu trùng cá Ngựa vằn qua từng ngày tại các nồng độ Zn khảo sát

Thời gian	Nồng độ gây chết 50% ấu trùng (LC ₅₀)
Ngày 1	6,12 mg/L
Ngày 2	3,94 mg/L
Ngày 3	3,33 mg/L
Ngày 4	2,95 mg/L
Ngày 5	2,66 mg/L
Ngày 6	2,17 mg/L
Ngày 7	1,77 mg/L

Từ Bảng 5 ta nhận thấy, giá trị LC₅₀ của ấu trùng cá Ngựa vằn giảm dần qua các ngày nuôi. Giá trị LC₅₀ tại ngày thứ 1 là **6,12 mg/L** giảm xuống còn **3,94 mg/L** tại ngày thứ 2. Sang ngày thứ 7, giá trị LC₅₀ đối với ấu trùng cá Ngựa vằn trong thí nghiệm là **1,77 mg/L**. Như vậy, có thể thấy sức sống của ấu trùng đã giảm đáng kể sau mỗi ngày

nuôi dưới tác động của Zn. Đến ngày thứ 7, chỉ cần một lượng Zn là 1,77 mg/L cũng làm cho số lượng ấu trùng chết hơn 50%. Theo QCVN 08-MT:2015/BTNMT, hàm lượng Zn cho phép trong nước sinh hoạt và ao hồ cho động vật thủy sinh dao động từ 0,5 - 1,0 mg/L [1]. Các giá LC_{50} tính được qua thực nghiệm đều vượt ngưỡng so với giới hạn cho phép.

3.2. Nhịp tim của ấu trùng cá Ngựa vằn tại các thời điểm và các nồng độ Zn khảo sát

Dựa vào kết quả về tỉ lệ sống của ấu trùng ở Bảng 1 và Bảng 5, bắt đầu từ nồng độ 6 mg/L ngay tại ngày nuôi thứ nhất tỉ lệ sống của ấu trùng đã chết vượt ngưỡng 50%, nên chúng tôi chỉ khảo sát nhịp tim trong giai đoạn này tại các nồng độ 1 - 5 mg/L và lô đối chứng qua mỗi ngày (từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7). Kết quả thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Nhịp tim của ấu trùng cá Ngựa vằn tại các nghiệm thức khảo sát

Ngày	Nhịp tim ấu trùng ở các nồng độ Zn (mg/L)					
	ĐC	1	2	3	4	5
1	277,00 ± 2,86 ^{aa}	261,60 ± 4,03 ^{ba}	240,20 ± 3,71 ^{ca}	235,00 ± 3,70 ^{ca}	214,60 ± 4,62 ^{da}	207,00 ± 2,74 ^{da}
2	272,20 ± 4,72 ^{aa}	246,00 ± 5,53 ^{baβ}	239,20 ± 5,93 ^{ba}	234,00 ± 6,60 ^{ba}	208,20 ± 5,04 ^{ca}	202,20 ± 4,26 ^{ca}
3	241,80 ± 5,42 ^{aβ}	234,20 ± 6,97 ^{abβ}	210,80 ± 5,49 ^{bcβ}	204,20 ± 5,91 ^{cβ}	202,80 ± 5,71 ^{ca}	199,60 ± 8,86 ^{ca}
4	232,60 ± 6,03 ^{aβ}	213,00 ± 4,42 ^{abγ}	192,60 ± 3,88 ^{cbγ}	191,40 ± 5,58 ^{cbγ}	158,40 ± 6,98 ^{cβ}	156,00 ± 9,58 ^{cβ}
5	206,60 ± 4,19 ^{aγ}	195,60 ± 4,40 ^{abγδ}	184,60 ± 5,04 ^{bγδ}	176,80 ± 5,74 ^{bγδ}	156,40 ± 4,82 ^{cβ}	153,20 ± 3,67 ^{cβ}
6	188,20 ± 4,02 ^{aγδ}	178,80 ± 3,46 ^{abδε}	172,20 ± 4,60 ^{bcδε}	160,40 ± 2,64 ^{cδ}	134,80 ± 4,61 ^{dγ}	119,60 ± 1,57 ^{eγ}
7	172,60 ± 2,40 ^{aδ}	169,00 ± 4,15 ^{ae}	162,60 ± 3,42 ^{abε}	156,20 ± 2,53 ^{bδ}	131,80 ± 2,95 ^{cγ}	98,40 ± 2,24 ^{dγ}

a, b, c, d: thể hiện sự khác biệt theo hàng ở độ tin cậy 95%

α, β, γ, δ, ε: thể hiện sự khác biệt theo cột ở độ tin cậy 95%

Qua số liệu thu được ở Bảng 6 ta nhận thấy, nhịp tim của ấu trùng cá Ngựa vằn trong 7 ngày khảo sát giảm dần theo sự tăng dần của nồng độ Zn trong môi trường nuôi, trong cùng một nồng độ nhịp tim ấu trùng cũng giảm dần qua các ngày nuôi. Cụ thể:

Tại ngày thứ 1, nhịp tim trung bình của ấu trùng ở lô đối chứng là $277 \pm 2,86$ nhịp/phút, tuy nhiên, ảnh hưởng của Zn đã làm tim đập chậm hơn và biến thiên theo sự tăng dần của nồng độ Zn. Nhịp tim của ấu trùng giảm từ (15,40 - 70 nhịp/phút) từ nồng độ từ 1 - 5mg/L so với đối chứng, sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 7, nhịp tim trung bình của ấu trùng có sự giảm dần theo sự tăng dần của nồng độ tương tự như ngày thứ 1. Tại ngày thứ 2, nhịp tim trung bình từ $272,20 \pm 4,72$ nhịp/phút ở lô đối chứng giảm xuống còn $246 \pm 5,53$ nhịp/phút ở nồng độ 1 mg/L và $202,20 \pm 4,26$ nhịp/phút ở nồng độ 5mg/L. Đến ngày thứ 7, so với đối chứng ($172,60 \pm 2,40$ nhịp/phút) thì nhịp tim trung bình tại nồng độ 1 mg/L là $169,00 \pm 4,15$ nhịp/phút và giảm xuống tới giá trị thấp nhất là $98,40 \pm 2,24$ nhịp/phút tại nồng độ 5 mg/L. Nhịp tim trung bình ở các nồng độ qua các ngày khi so sánh với lô đối chứng đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ngoại trừ nồng độ 1 mg/L từ ngày 3 - ngày 7), $p < 0,05$.

Ở giai đoạn ấu trùng, nồng độ Zn càng cao càng làm giảm nhịp tim của ấu trùng cá Ngựa vằn. Điều này có thể được giải thích như sau:

Ấu trùng đã được phơi nhiễm Zn ngay từ giai đoạn phôi, Zn sẽ xâm nhập vào các cấu trúc bên trong phôi, tích lũy, cuối cùng sẽ đi vào máu. Zn theo máu đến các cơ quan, gây ảnh hưởng nhất định đến hoạt động các cơ quan, trong đó có tim. Từ đó, Zn ảnh hưởng lên nhịp tim, điều này được thể hiện rõ ở các giai đoạn về sau. Sau một thời gian phơi nhiễm, nhịp tim khi đã đạt đến một ngưỡng nào đó sẽ bắt đầu giảm dần.

Ấu trùng sau khi nở đã không còn được bảo vệ bởi lớp vỏ noãn hoàng và lớp màng đệm cứng bao bên ngoài. Hai lớp này hoạt động như một hàng rào ngăn chặn các hợp chất độc hại xâm nhập. Chính vì vậy, Zn với hàm lượng lớn sẽ tác động trực tiếp đến đến cơ thể ấu trùng, kim loại này sẽ xâm nhập vào cơ thể qua da, qua mang, qua miệng gây stress cho sự phát triển của ấu trùng và làm giảm nhịp tim của chúng. [6]

3.3. Kích thước của ấu trùng cá Ngựa vằn tại các thời điểm và các nồng độ Zn khảo sát

Tương tự như bố trí thí nghiệm khảo sát nhịp tim, chiều dài ấu trùng cũng được khảo sát tại các nồng độ Zn từ 1 - 5 mg/L và lô đối chứng qua mỗi ngày nuôi (từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7). Kết quả được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7. Kích thước của ấu trùng cá Ngựa vằn tại các nghiệm thức khảo sát

Ngày	Kích thước ấu trùng ở các nồng độ Zn (mg/L)					
	ĐC	1	2	3	4	5
1	$3,63 \pm 0,04^{aa}$	$3,57 \pm 0,03^{ab\alpha}$	$3,54 \pm 0,02^{ab\alpha}$	$3,52 \pm 0,03^{ab\alpha}$	$3,49 \pm 0,04^{ba}$	$3,48 \pm 0,03^{ba}$
2	$3,87 \pm 0,04^{af\beta}$	$3,78 \pm 0,02^{ab\beta}$	$3,66 \pm 0,04^{bc\alpha\beta}$	$3,64 \pm 0,03^{cd\beta}$	$3,52 \pm 0,03^{cd\alpha}$	$3,50 \pm 0,05^{da}$
3	$3,94 \pm 0,04^{af\beta}$	$3,85 \pm 0,03^{ab\beta\gamma}$	$3,71 \pm 0,04^{bc\beta\gamma}$	$3,68 \pm 0,04^{c\beta}$	$3,56 \pm 0,04^{cd\alpha\beta}$	$3,51 \pm 0,04^{da}$
4	$3,96 \pm 0,02^{af\beta}$	$3,90 \pm 0,03^{ab\gamma}$	$3,77 \pm 0,03^{bc\beta\gamma}$	$3,70 \pm 0,03^{cd\beta}$	$3,58 \pm 0,03^{de\alpha\beta}$	$3,52 \pm 0,05^{ea}$
5	$3,97 \pm 0,02^{af\beta}$	$3,90 \pm 0,02^{a\gamma}$	$3,77 \pm 0,04^{b\beta\gamma}$	$3,71 \pm 0,03^{b\beta}$	$3,59 \pm 0,03^{c\alpha\beta}$	$3,59 \pm 0,03^{ca}$
6	$3,98 \pm 0,02^{af\beta}$	$3,91 \pm 0,02^{a\gamma}$	$3,78 \pm 0,03^{b\beta\gamma}$	$3,72 \pm 0,03^{bc\beta}$	$3,66 \pm 0,03^{cd\beta}$	$3,59 \pm 0,02^{da}$
7	$3,98 \pm 0,02^{af\beta}$	$3,93 \pm 0,02^{a\gamma}$	$3,79 \pm 0,02^{b\gamma}$	$3,73 \pm 0,02^{bc\beta}$	$3,68 \pm 0,02^{cd\beta}$	$3,60 \pm 0,02^{da}$

a, b, c, d: thể hiện sự khác biệt theo hàng ở độ tin cậy 95%

α, β, γ : thể hiện sự khác biệt theo cột ở độ tin cậy 95%

Kết quả Bảng 7 cho thấy, chiều dài trung bình của ấu trùng giảm theo tuyến tính theo sự tăng dần của nồng độ Zn qua các ngày. Cụ thể:

Tại ngày thứ nhất, chiều dài của ấu trùng được gây nhiễm Zn ở các nồng độ 4 và 5 mg/L ngắn hơn và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$) so với chiều dài của các ấu trùng ở lô đối chứng. Chiều dài trung bình ở nồng độ 1; 2 và 3 mg/L khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với lô đối chứng ($p > 0,05$). Bắt đầu từ nồng độ 4 mg/L, chiều dài mới có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với lô đối chứng ($p = 0,02$). Cụ thể, chiều dài của ấu trùng ở môi trường có nồng độ 4mg/L ngắn hơn lô đối chứng là 0,14 mm; với 95% dao động trong khoảng 0,01 - 0,26 mm ($p = 0,028$). Chiều dài trung bình thấp nhất ở nồng độ 5 mg/L ($3,48 \pm 0,03$ mm) và khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với lô đối chứng ($p < 0,05$).

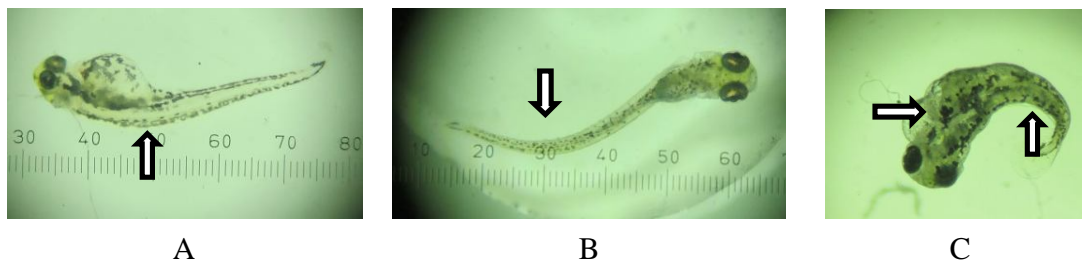
Tính đến ngày thứ 7, chiều dài ở các nồng độ 2; 3; 4 và 5 mg/L có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với lô đối chứng với độ tin cậy cao ($p = 0,00$). Nồng độ 1mg/L có khác biệt so với lô đối chứng nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). So sánh chiều dài ấu trùng giữa nồng độ 1 mg/L và 2 mg/L có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p = 0,00$), giữa các nồng độ kế cận còn lại có khác biệt nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Trong các nồng độ Zn khảo sát, nồng độ 5 mg/L ảnh hưởng mạnh nhất đến sự thay đổi chiều dài ấu trùng cá Ngựa vằn. Cụ thể, chiều dài của ấu trùng ở môi trường có nồng độ Zn 5 mg/L đạt giá trị thấp nhất trong tất cả các nồng độ ($3,60 \text{ mm} \pm 0,02$), ngắn hơn lô đối chứng là 0,38 mm ($p = 0,00$).

Như vậy, tính từ ngày thứ nhất sau khi bắt đầu nuôi, chúng tôi nhận thấy sự tăng dần nồng độ Zn đã ảnh hưởng đến kích thước của ấu trùng cá Ngựa vằn, Zn đã làm chậm tăng trưởng ở ấu trùng cá Ngựa vằn. Các nồng độ 1; 2 và 3 mg/L chưa có sự ảnh hưởng rõ rệt đến kích thước của ấu trùng. Các nồng độ 4 và 5 mg/L có ảnh hưởng mạnh nhất trong các nồng độ khảo sát. Nguyên nhân có thể là do cơ thể cá có xu hướng hấp thu các ion từ môi trường bên ngoài (qua cả hai con đường: hấp thu trực tiếp hay qua đường tiêu hóa). Mặc dù chúng luôn có cơ chế để tự loại bỏ, ví dụ như hoạt động của gen *abcc2*, protein liên kết kim loại... nhưng khi tiếp xúc với Zn ở nồng độ cao được đòi hỏi tiêu hao nhiều năng lượng để giải độc cơ chế và chống lại sự stress oxi hóa. [9]

Tóm lại, nồng độ Zn trong môi trường càng cao càng làm giảm tỉ lệ sống của ấu trùng cá ngựa vằn giai đoạn từ 1 - 7 ngày tuổi. Đã xác định được nồng độ Zn gây chết 50% ấu trùng cá qua từng ngày khảo sát. Nhịp tim và kích thước ấu trùng cá Ngựa vằn giảm tuyến tính theo sự tăng dần của nồng độ Zn khảo sát.

3.4. Ảnh hưởng của Zn lên sự xuất hiện các dị tật của ấu trùng cá Ngựa vằn

Ấu trùng cá Ngựa vằn được gây nhiễm Zn liên tục suốt từ giai đoạn phôi đã xuất hiện dị dạng ở các cơ quan. Quan sát hình thái của 150 ấu trùng cá Ngựa vằn ở mỗi nồng độ khảo sát dưới kính hiển vi soi nổi và kính hiển vi đảo ngược, chúng tôi đã ghi nhận các dạng bất thường trong hình thái của ấu trùng ở từng nồng độ khác nhau trong suốt giai đoạn ấu trùng. Một số dạng bất thường trong quá trình phát triển của ấu trùng bao gồm: biến dạng cột sống, phù nề màng ngoài tim (Hình 2).



Hình 2. Các dạng dị tật ở ấu trùng cá Ngựa vằn (X10),

Mũi tên chỉ vị trí dị tật; A, B: dị tật cột sống; C: dị tật cột sống và phù tim

Hiện nay, cơ chế gây dị tật ở cá do kẽm vẫn chưa được làm rõ. Tuy nhiên, sự ức chế tổng hợp DNA do thừa kẽm có thể là lời giải thích có khả năng nhất. Sự tăng nhẹ của hàm lượng kẽm có thể kích thích sự tổng hợp DNA, trong khi thiếu hụt hay quá dư thừa kẽm lại làm ức chế tổng hợp DNA. Ức chế tổng hợp DNA đã được chứng minh là một trong những nguyên nhân gây ra dị tật hay quái thai ở động vật. Rõ ràng thiếu kẽm là nguyên nhân gây ra quái thai ở động vật có vú, còn thừa kẽm lại ít gây quái thai hơn, điều này có thể do cơ chế bảo vệ của gan và các metallothionein trong nhau thai của con mẹ. Trong khi cá Ngựa vằn là loài đẻ trứng, vì thế phôi và ấu trùng sẽ không nhận được sự bảo vệ từ cá mẹ. [9, 11]

4. Kết luận

- Trong các nồng độ Zn khảo sát, nồng độ **1mg/L** là ngưỡng ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của ấu trùng. Qua mỗi ngày nuôi, tỉ lệ sống của ấu trùng giảm đi 0,961 lần.
- Trong cùng một nồng độ khảo sát, ngay tại ngày thứ 1 đã có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ sống của ấu trùng. Cứ tăng 1 mg/L Zn thì tỉ lệ sống của ấu trùng giảm đi 0,893 lần.
- Lập được phương trình tiên đoán tỉ lệ sống của ấu trùng cá Ngựa vằn theo ảnh hưởng tương tác giữa hai yếu tố nồng độ Zn khảo sát và thời gian nuôi qua từng ngày, xác định được giá trị LC_{50} gây chết 50% ấu trùng từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 7.
- Nhịp tim và kích thước ấu trùng cá Ngựa vằn giảm tuyến tính theo sự gia tăng của nồng độ Zn khảo sát và thời gian nuôi. Ở ngày thứ 7, nhịp tim và kích thước ấu trùng có giá trị thấp nhất ở nồng độ Zn = 5 mg/L với giá trị là $98,40 \pm 2,24$ nhịp/phút và $3,60 \pm 0,02$ mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Tài nguyên và Môi trường (2015), *Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về chất lượng nước mặt*, QCVN 08-MT: 2015/BTNMT, Hà Nội.
2. Huỳnh Trung Hải và Trần Lê Minh (2013), “Nghiên cứu xử lý niken, kẽm, đồng và chì trong môi trường nitrat bằng vỏ Ngao”, *Hội nghị khoa học lần thứ 20*, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, tr.66 - 72.
3. Begum, A., Harikrishna, S., & K.I. (2009), “Analysis of Heavy metals in Water Sediments and Fish samples of Madivala Lakes of Bangalore, Karnakata”, *International Journal of ChemTech Research*, Vol.1(2), 245 – 249.
4. Brun, N.R., M. Lenz, Wehrli, B., & Fent, K. (2014), “Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: importance of zinc ions”, *Sci Total Environ*, 476-477: p. 657-66.
5. Chen, T.H., C.C. Lin, & P.J. Meng (2014), “Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*)”, *J Hazard Mater*, 277: 134-40.
6. Hwang, P.P., Lin, S.W., & Lin, H.C. (1995), *Different sensitivities to cadmium in tilapia larvae (Oreochromis mossambicus, Teleostei)*, Arch, Environ, Contam. Toxicol, 29, 1 - 7.
7. Jardine, D., & Litvak, M. K. (2003), “Direct yolk sac volume manipulation of zebrafish embryos and the relationship between offspring size and yolk sac volume”, *Journal of Fish Biology*, Vol. 63(2), 388 - 397.
8. Lawrence Christian (2007), “The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review”, *Aquaculture*, 269, 381 - 91.
9. Long Y., L.Q., Zhong S., Wang Y., & Cui Z. (2011), “Molecular characterization and functions of zebrafish ABCC2 in cellular efflux of heavy metals”, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 153(4): 381-91.
10. Roch, M., McCarter, J.A., Matheson, A.T., Clark, M.J.R., & Olafson, R.W. (1982), “Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 1596 - 601.
11. Westerfield, M. (2007), *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, University of Oregon Press. Paperback.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 15-4-2016; ngày phản biện đánh giá: 23-4-2016;
ngày chấp nhận đăng: 13-6-2016)