

ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA CADMIUM (Cd) LÊN QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN CỦA PHÔI CÁ NGỰA VẼN - *DANIO RERIO* (HAMILTON, 1822)

NGUYỄN THỊ THƯƠNG HUYỀN^{*}, PHAN THANH HUY^{**}, TRẦN ANH HUY^{**},
NGUYỄN THỊ THU GIANG^{***}, LÊ THÀNH LONG^{****}, NGUYỄN TƯỜNG ANH^{*****}

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, phôi cá Ngựa vằn được sử dụng để đánh giá tác động của cadmium lên quá trình phát triển thông qua tỉ lệ sống, chết của phôi ở 4 giai đoạn: phôi nang, phôi vị, phân đốt và hình thành hầu, họng. Đồng thời ảnh hưởng của cadmium qua nhịp tim và nhịp quẫy mình của phôi ở các nồng độ cadmium 0,1; 1; 5; 10; 20; 50 và 100µg/l được đánh giá. Kết quả cho thấy các nồng độ này vẫn chưa phải là nồng độ gây chết phôi, phôi có tỉ lệ sống cao, cadmium làm tăng nhịp tim, đồng thời làm giảm nhịp quẫy mình.

Từ khóa: cá Ngựa vằn, cadmium, nhịp tim, phôi, quẫy mình.

ABSTRACT

*Evaluating the effect of cadmium (cd) on embryonic development of zebrafish - *Danio rerio* (Hamilton, 1822)*

In this study, zebrafish embryos were used to evaluate the effects of cadmium on zebrafish embryos at 4 developmental stages: blastula, gastrula, segmentation and pharyngeal period using the ratio of live embryos to dead embryos. Moreover, heartbeat and turning beat of embryos were also observed and estimated when they were exposed to 0; 0,1; 1; 5; 10; 20; 50; and 100µg/l cadmium. The result shows that these concentration were not threshold of embryos, percentage of alive embryos was quite high, cadmium caused heartbeat increase, and also turning beat decrease.

Keywords: Zebrafish, cadmium, heartbeat, embryos, body turning.

1. Giới thiệu

Cadmium (Cd) là một trong số các kim loại nguy hiểm đối với cơ thể con người và thủy sinh vật. Việc nghiên cứu tác động của Cd lên sự sống sinh vật có thể sử dụng nhiều mô hình *in vivo* hoặc

in vitro và một trong những mô hình phổ biến để đánh giá tác động của cadmium đó chính là mô hình cá Ngựa vằn [7]. Cá Ngựa vằn - *Danio rerio* (Hamilton, 1822) là loài cá nhiệt đới, thuộc họ cá Chép (Cyprinidae), sống ở đáy với chiều dài cá trưởng thành trung bình là từ 3 – 5cm. Cá Ngựa vằn có khả năng chịu được những phạm vi nhiệt độ rộng. Ngưỡng nhiệt độ tối ưu cho cá Ngựa vằn vẫn chưa được xác định một cách rõ ràng, tuy nhiên, 28,5°C là nhiệt độ duy trì được Westerfield (1995) đề nghị cho hầu hết

^{*} ThS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

^{**} CN, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

^{***} CN, Trường Đại học Nông Lâm TPHCM

^{****} ThS, Viện Sinh học Nhiệt đới TPHCM

^{*****} PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên ĐHQG TPHCM

các điểm nuôi cá Ngựa vằn [5]. Phôi cá đang phát triển hoặc ấu trùng nhìn chung là có tính nhạy cảm cao nhất trong vòng đời cá. Vì vậy, phôi cá hoặc ấu trùng có thể được sử dụng làm chỉ thị sinh học để xác định các chỉ tiêu chất lượng nước [8].

Đề tài này trình bày các kết quả nghiên cứu về sự ảnh hưởng của kim loại cadmium lên tỉ lệ sống, chết, nhịp tim và hoạt động quẫy mình của phôi cá Ngựa vằn ở các giai đoạn: phôi nang, phôi vị, giai đoạn phân đốt và giai đoạn hình thành hầu họng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

Dung dịch Cd^{2+} được chuẩn bị ở các nồng độ 0; 0,1; 1; 5; 10; 20; 50; 100 μ g/l. Nước nuôi cá và nuôi phôi 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 – 3hpf), phôi vị (5hpf), giai đoạn phân đốt (10 – 24hpf) và giai đoạn hình thành hầu họng (24 – 48hpf).

2.3. Phương pháp

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Giải phẫu – Sinh lý 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 sáng – tối là 14h – 10h 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 kì sáng tối cho cá. Tháo vách ngăn để cá phối với nhau. Sau 3 – 5 phút cho phối, toàn bộ phôi được thu sang cốc thủy tinh 1000ml, và tiến hành phân loại phôi. Những phôi tốt được thu nhận vào các đĩa petri thủy tinh sạch có đường kính 35mm để nuôi phôi.

Phương pháp nuôi phôi

Phôi được nuôi trong 300ml nước có cadmium ở các nồng độ 0,1; 1; 5; 10; 20; 50; 100 μ g/l và đối chứng (0 μ g/l). Sự sống phôi cá ở các giai đoạn được kiểm tra bằng quan sát hình thái dưới kính hiển vi đảo ngược, đồng thời quan sát nhịp tim ở giai đoạn phân đốt và ở giai đoạn hình thành hầu họng.

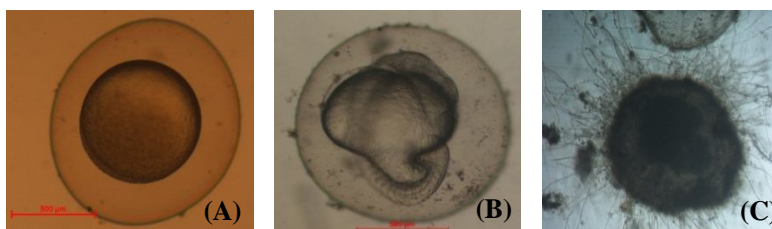
Phương pháp xử lí thống kê

Các số liệu được xử lí thống kê bằng phần mềm SigmaPlot 11.0 để so sánh sự khác biệt ở tất cả các chỉ tiêu thực hiện trên các nhóm khảo sát. Số liệu được trình bày ở dạng $\bar{x} \pm SD$ ($P \leq 0,001$).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng cadmium lên tỉ lệ sống của phôi cá Ngựa vằn

Sau khi phân loại, đề tài thu được đa số phôi tốt là các phôi có sự phát triển bình thường về cấu trúc phôi bì: phôi có dạng tròn đều, trong suốt; màng phôi nguyên vẹn; khối noãn hoàng đặc đều, có độ trong đồng nhất ứng với từng giai đoạn phân chia (hình 1A).



Hình 1. Hình thái phôi cá Ngựa vằn quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (x10)
 (A) Phôi phát triển bình thường
 (B) Phôi bất thường
 (C) Phôi chết

Các phôi phát triển bất thường: mặc dù vẫn có sự di chuyển của dòng sinh chất, tuy nhiên có sự biến đổi về hình thái phôi (hình 1B). Đối với phôi chết, toàn bộ cấu trúc nhân bên trong bị biến dạng hoàn toàn, xuất hiện màu đen thẫm hoặc màu trắng đục, đồng thời dòng tế bào chất ngừng di chuyển.

Hầu hết, các phôi chết theo hình thái đều xuất hiện các tua sợi bám xung quanh lớp vỏ phôi (hình 1C).

Kết quả tỉ lệ phần trăm phôi sống ở từng giai đoạn của mỗi nồng độ thí nghiệm được trình bày trong bảng 1:

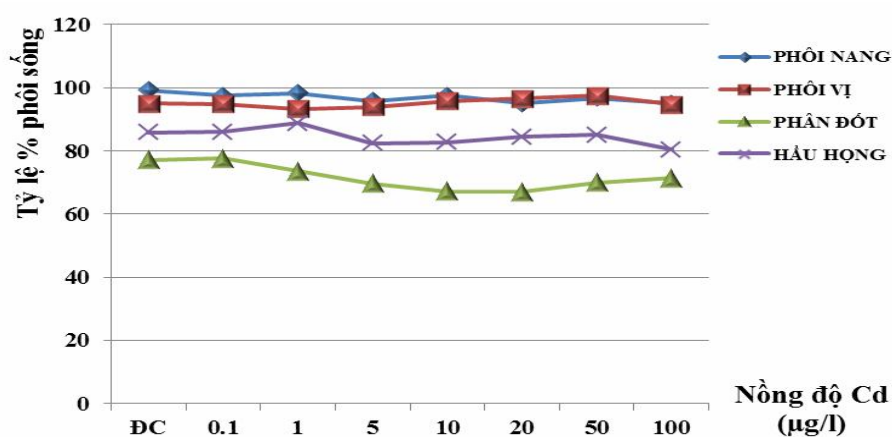
Bảng 1. Tỉ lệ % phôi sống của mỗi giai đoạn, ở các nồng độ gây nhiễm

Các giai đoạn của phôi	Tỉ lệ (%) phôi sống ở các nồng độ Cd gây nhiễm								p	TB
	ĐC	0,1 µg/l	1 µg/l	5 µg/l	10 µg/l	20 µg/l	50 µg/l	100 µg/l		
Phôi nang	99,17 ± 2,04	97,5 ± 2,74	98,33 ± 2,58	95,83 ± 2,04	97,5 ± 2,74	95 ± 4,47	96,67 ± 2,58	95 ± 3,16	0,14 2	96,77* ± 0,73
Phôi vị	95 ± 4,47	94,91 ± 4,59	93,25 ± 4,04	93,86 ± 5,18	95,75 ± 5,86	96,53 ± 2,7	97,46 ± 2,79	94,78 ± 4,6	0,64 3	95,19* ± 1,6
Phân đốt	77,12 ± 9,39	77,57 ± 9,75	73,59 ± 20,04	69,68 ± 21,45	67,18 ± 15,97	67 ± 23,6	69,93 ± 9,12	71,35 ± 5,2	0,90 7	71,68* ± 11,56
Hầu hống	85,79 ± 11,29	86,02 ± 5,87	88,84 ± 13,84	82,42 ± 10,14	82,75 ± 9,153	84,4 ± 13,23	85,1 ± 8,18	80,44 ± 9,33	0,91 3	84,47* ± 3,73

*Giá trị có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,001$)

Từ bảng 1 cho thấy p dao động từ 0,142 ÷ 0,913 là không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả này chứng tỏ tỉ lệ sống của phôi ở các nồng độ Cd gây nhiễm qua các giai đoạn phát triển tương đương nhau. Đồng thời, tỉ lệ sống của phôi qua các giai đoạn là khá cao (thấp nhất là 71,68% ở giai đoạn phân đốt). Điều này là do có sự hiện diện của lớp màng đệm đóng vai trò như một rào chắn giúp ngăn

Cd xâm nhập vào phôi. Tuy nhiên, Cd vẫn có thể ảnh hưởng đến các cấu trúc bên trong của phôi. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Carlyn và cs (2007) [3], đã khẳng định sức sống của phôi cá cao hơn so với giai đoạn cá ấu trùng do được màng đệm bảo vệ. Như vậy, cadmium ở các nồng độ trên chưa phải là ngưỡng gây chết của phôi cá Ngựa vằn.



Hình 2. Biểu đồ tỉ lệ (%) phôi sống qua các giai đoạn phát triển ở các nồng độ Cd gây nhiễm

Tỉ lệ phôi sống trung bình ở giai đoạn phân đốt (71,68%) nhìn chung là thấp hơn hẳn so với giai đoạn phôi nang (96,77%), phôi vị (95,19%) và giai đoạn hình thành hậu hộng (84,47%). Cuối giai đoạn phôi vị và bắt đầu sang giai đoạn phân đốt có sự biệt hóa tế bào và hình thành nên một số cơ quan. Lúc này, phôi vẫn được bảo vệ bởi lớp vỏ phôi bên ngoài. Vì thế, nguyên nhân dẫn đến tỉ lệ sống ở giai đoạn phân đốt thấp có thể do các rối loạn trong quá trình biệt hóa tế bào. Khi trải qua giai đoạn phân đốt và đến giai đoạn hình thành hậu hộng, các cơ quan đã dần hình thành khá đầy đủ và

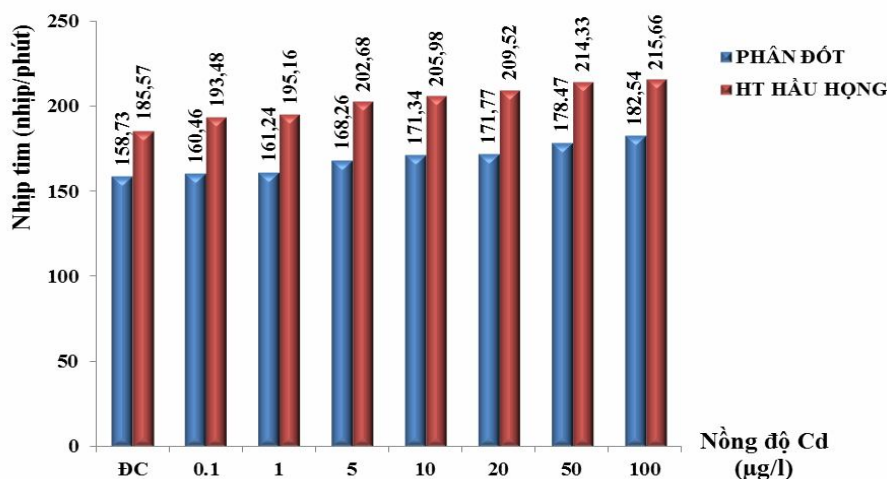
có sự ổn định về cấu trúc bên trong. Do đó, ở giai đoạn hình thành hậu hộng có tỉ lệ sống cao hơn so với giai đoạn phân đốt. Bên cạnh đó, phôi khi được phơi nhiễm với Cd sẽ sản sinh ra protein stress hsp70, là một marker ở điều kiện stress của động vật. Hsp70 sẽ khóa cơ chế tự chết (apoptosis) bằng Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1) vì thế sẽ ngăn chặn cấu trúc apoptosome (phức hợp Apaf-1/ cytochrome c/caspase-9). Hsp70 đạt mức cao nhất ở giai đoạn hình thành hậu hộng (trước khi thoát nang), và do những tác động bệnh lí của tress (cadmium) sẽ kích hoạt tế bào sản sinh

nhiều hsp70 giúp bảo vệ phôi với các stress của môi trường nuôi. Nghiên cứu của Krone và cs (1997) cũng đã khẳng

định có sự xuất hiện của protein stress hsp70 trong phôi cá Ngựa vằn khi bị phơi nhiễm với hóa chất [10].

3.2. Ảnh hưởng Cd lên cấu trúc bên trong của phôi cá Ngựa vằn

3.2.1. Ảnh hưởng lên hoạt động của tim



Hình 3. Biểu đồ thể hiện nhịp tim phôi giai đoạn phân đốt và giai đoạn hình thành hầu họng

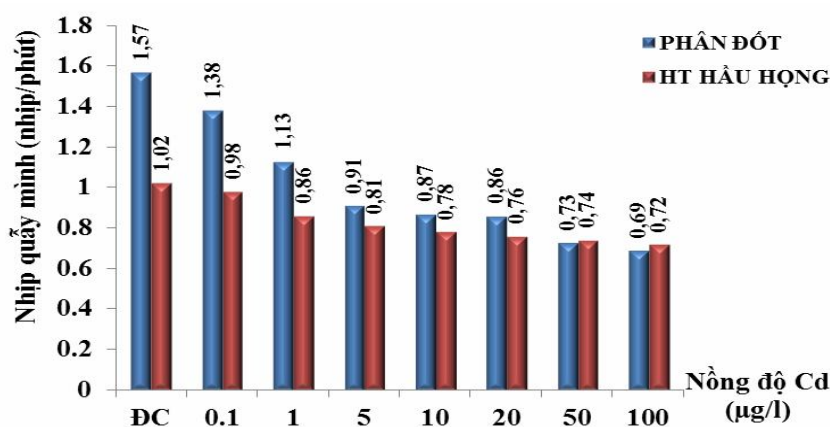
Ở cả hai giai đoạn khảo sát, nhịp tim trung bình của phôi thay đổi và biến thiên theo sự tăng dần của nồng độ Cd. Đối với giai đoạn phân đốt, nhịp tim của phôi được gây nhiễm Cd ở các nồng độ 10µg/l, 20µg/l, 50µg/l và 100µg/l tăng lên từ 12 ÷ 24 nhịp/phút so với nhịp tim của các phôi đối chứng (171; 172; 178 và 182 nhịp so với 158 nhịp, $p \leq 0,001$ tương ứng). Đồng thời, ở giai đoạn hình thành hầu họng, nhịp tim của các phôi được gây nhiễm ở nồng độ Cd 100µg/l đạt giá trị cao nhất (216 nhịp/phút), tăng lên 31 nhịp/phút ($p \leq 0,001$) so với lô đối chứng. Như vậy, với lượng tích tụ Cd càng lớn sẽ làm nhịp tim của phôi càng tăng.

Cadmium tích tụ trong cơ thể sẽ theo máu đến toàn bộ cơ thể và gây ra những ảnh hưởng nhất định đến sự hoạt động của các hệ cơ quan. Trong đó, có sự ảnh hưởng đến hoạt động của tim và càng ảnh hưởng cao khi phôi phát triển đến các giai đoạn về sau. Có thể nhận thấy nhịp tim của phôi ở giai đoạn hình thành hầu họng có sự tăng lên đồng loạt so với nhịp tim của các phôi ở giai đoạn phân đốt. Nguyên nhân có thể là do: khi phôi ở giai đoạn phân đốt vẫn còn được bảo vệ bởi lớp vỏ phôi bên ngoài nên làm giảm đáng kể áp lực nước lên phần cấu trúc phôi bên trong và các vận động của cơ thể còn hạn chế. Đến giai đoạn hình thành hầu họng, màng bao phôi mỏng dần, cơ thể hình thành nên các cơ quan

thô sơ, do đó hoạt động của cơ thể tăng lên làm tăng hoạt động tuần hoàn. Bên cạnh đó, theo Hallare và cs (2005), nhịp tim là một thông số đáng tin cậy đã được sử dụng thành công để định lượng stress sinh lí và stress về sự phát triển trong phôi cá Ngựa vằn [6]; nhịp tim cá Ngựa vằn sẽ ngày càng tăng cao cho đến khi van tim cá hoàn thiện sau 50 ngày thụ tinh; đây cũng là một trong những nguyên nhân giải thích nhịp tim cá ở giai đoạn hình thành hầu họng tăng cao hơn so với giai đoạn phân đốt.

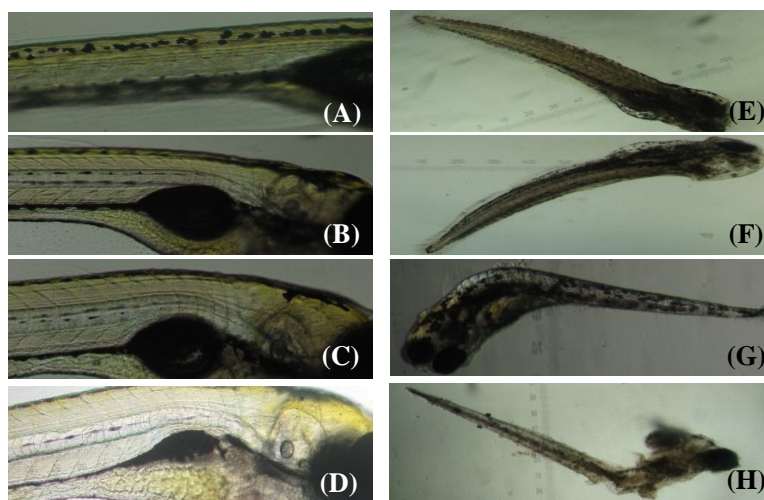
3.2.2. Ảnh hưởng Cd lên hoạt động quấy mình

Theo biểu đồ hình 4, phôi lô đối chứng ở giai đoạn phân đốt có số lần quấy mình trung bình 1,57 lần/phút. Tuy nhiên, dưới ảnh hưởng của cadmium, số lần quấy mình của chúng giảm xuống. Cụ thể, khi các phôi được gây nhiễm ở nồng độ càng cao thì tần số quấy mình càng thấp. Số lần quấy mình ở các nồng độ 5µg/l, 10µg/l, 20µg/l, 50µg/l và 100µg/l so với lô đối chứng là có sự khác biệt về mặt thống kê ($p \leq 0,001$).



Hình 4. Biểu đồ thể hiện nhịp quấy mình của phôi giai đoạn phân đốt và giai đoạn hình thành hầu họng

Đồng thời, khi bước vào giai đoạn hình thành hầu họng, hoạt động quấy mình của phôi cá giảm so với giai đoạn phân đốt và nhịp quấy mình cũng giảm theo sự tăng nồng độ Cd gây nhiễm. Như vậy, Cd đã gây ảnh hưởng lên phôi, từ đó tác động đến hoạt động của hệ cơ – xương (hình 5). Kết quả là với lượng Cd tích lũy càng cao sẽ làm giảm hoạt động quấy mình.



Hình 5. Ảnh hưởng của Cd lên cột sống cá con sau khi nở ở các nồng độ. (A) đối chứng; (B) 0,1µg/l; (C) 1µg/l; (D) 5µg/l [x20], (E) 10µg/l; (F) 20µg/l; (G) 50µg/l; (H) 100µg/l [x10]

Phôi cá ở giai đoạn hình thành hầu hệt có tần suất quấy mình thấp hơn so với giai đoạn phân đốt, điều này cho thấy rằng cột sống của cá bị ảnh hưởng bởi cadmium. Khi cá bị phơi nhiễm cadmium sẽ bị xáo trộn con đường chuyển hóa vitamin D3, gây rối loạn sự hấp thụ và chuyển hóa Ca^{2+} , rối loạn sự biến dưỡng và hấp thụ phosphocalci của xương. Đồng thời ruột không hấp thụ được calci và phosphore nên calci máu sẽ bị giảm, do đó calci từ xương sẽ được huy động để ổn định nguồn calci máu bị thiếu hụt, sẽ gây loãng xương, xốp xương. Ngoài ra, cadmium còn làm giãn nở rãnh ống Haversian và gia tăng khoáng hóa xương [1, 2]. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Hallare và cs (2005) khi phơi nhiễm phôi với cadmium, cá ấu trùng sau khi thoát nang có hiện tượng bị phù ở đầu, cong cột sống, cơ thể hình xoắn ốc, đuôi dạng cong móc hoặc bị tiêu biến,

không bơi, tư thế cơ thể bị biến dạng [6]. Mặt khác, qua quan sát hình thái nhận thấy ở nồng độ Cd bị phơi nhiễm càng cao, cơ thể cá bị biến dạng càng nhiều, kích thước cơ thể ngắn (hình 5E, F, G) đồng thời có sự giảm trọng lượng của cơ thể. Điều này là do các phôi khi được xử lí với cadmium sẽ không biểu hiện gene *even-skipped1* là gene quan trọng trong việc kéo dài đuôi. Tiêu biến hoặc biến dị đuôi cũng được báo cáo trong nhiễm độc chì [9]. Sự giảm hoạt động và giảm khả năng bơi lội của ấu trùng có thể làm cản trở sự phối hợp cơ – thần kinh [4].

4. Kết luận

Các kết quả thu được chỉ ra rằng phôi cá Ngựa vằn khi bị phơi nhiễm môi trường có chứa cadmium vẫn cho tỉ lệ sống cao (thấp nhất là $67 \pm 23,6\%$ ở giai đoạn phân đốt, cao nhất là $99,17 \pm 2,04\%$).

Nhịp tim của phôi gia tăng theo giai đoạn phát triển, nhịp tim của phôi ở giai đoạn hình thành hầu hống có sự tăng cao đồng loạt so với nhịp tim của các phôi ở giai đoạn phân đốt; cụ thể ở lô đối chứng giai đoạn phân đốt và giai đoạn hình thành hầu hống có nhịp tim tương ứng là 158,73 và 185,57 nhịp/phút. Đồng thời, nhịp tim trung bình của phôi thay đổi và biến thiên theo sự tăng dần của nồng độ Cd. Phôi được gây nhiễm ở nồng độ cadmium 100 μ g/l có nhịp tim tăng mạnh so với lô đối chứng ở cả hai giai đoạn khảo sát (182,54 và 158,73 nhịp/phút; 215,66 và 185,57 nhịp/phút).

Dưới ảnh hưởng của cadmium, số lần quẫy mình của phôi giảm xuống. Cụ thể, khi các phôi được gây nhiễm ở nồng độ càng cao thì tần số quẫy mình càng thấp. Đồng thời, khi bước vào giai đoạn hình thành hầu hống, hoạt động quẫy mình của phôi cá giảm so với giai đoạn phân đốt (1,57 nhịp/phút giảm còn 0,69 nhịp/phút ở giai đoạn phân đốt và 1,02

nhịp/phút giảm còn 0,72 nhịp/phút ở giai đoạn hình thành hầu hống).

Tóm lại, trên thế giới hiện nay đã có nhiều công trình nghiên cứu có liên quan đến đối tượng cá Ngựa vằn. Tuy nhiên vẫn chưa có tác giả nào đề cập đến những ảnh hưởng của kim loại cadmium lên sự sống, đồng thời là những bất thường về nhịp tim, hoạt động quẫy mình của cá khi còn ở giai đoạn phôi bào. Mặt khác, ở Việt Nam, việc đánh giá tác động của kim loại nặng cadmium chủ yếu bằng các phương pháp hóa lí, chưa có sự đánh giá một cách chính xác lên sự phát triển của các động vật thủy sinh nhất là động vật có xương sống. Đặc biệt cho đến thời điểm này chưa có một công trình nào công bố về ảnh hưởng của cadmium lên sự phát triển phôi cá Ngựa vằn. Chính vì vậy, những kết quả nghiên cứu đạt được sẽ là tiền đề cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về độc học kim loại nặng trên mô hình động vật thủy sinh sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Huy Bá (2006), *Độc học môi trường*, tập II. Nxb Đại học Quốc gia TPHCM.
2. Bentley P.J. (1990), "Accumulation of cadmium by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influx from environmental solutions", *Com. Biochem. Physiol*, (99C), pp. 527-529.
3. Carlyn J.M., Ronald G.T., Patrick H.K. (2007), "Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (66), pp. 44-48
4. Cheng S.H., Wing K.W.A., Hung S.C., Shiu S.W.R. (2000), "Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos", *Environ. Toxicol Chem*, 19(12), pp. 3024-3031.
5. Christian L. (2007), "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review". *Aquaculture*, 269, pp. 1-20.

6. Hallare A.V., Schirlinga M., Luckenbacha T., Kohler H.R., Triebkorn R. (2005), “Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos”, *Journal of Thermal Biology*, (30), pp.7-17
7. Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., and Peterson R.E. (2005), “Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity”, *Toxicological Sciences*, 86(1), pp.6-19.
8. 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), pp. 1-7.
9. Krone P.H., Sass J. B., Lele Z. (1997). “Heat shock protein gene expression during embryonic development of the zebrafish”, *CMLS, Cell. mol. life sci*, (53), pp. 122-129
10. Ozoh P.T.E. (1979), “Malformations and inhibitory tendencies induced to *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) eggs and larvae due to exposures in low concentrations of lead and copper ions”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, (21), pp. 668-675.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 11-9-2012; ngày phản biện đánh giá: 10-10-2012;
ngày chấp nhận đăng: 23-10-2012)

NGHIÊN CỨU VỀ KHẢ NĂNG DỰ TRỮ KHÍ Ở LÁ ...

(Tiếp theo trang 122)

Phụ lục bảng 6. Kết quả phân tích sự sai khác về thể tích khí có thể dự trữ ở lá Đước đôi với các độ mặn khác nhau

Multiple Range Tests for THE TICH KHI by DO MAN			
Method: 95.0 percent LSD			
DO MAN	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
15	10	0.69	X
25	15	1.70667	X
30	10	0.89	X

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 25-6-2012; ngày phản biện đánh giá: 17-7-2012;
ngày chấp nhận đăng: 30-10-2012)