ĐÁNH GIÁ SỰ TÁC ĐỘNG CỦA CHÌ LÊN QUÁ TRÌNH PHÁT TRIỂN PHÔI CÁ NGỰA VẰN - *DANIO RERIO* (HAMILTON, 1822)

TRẦN THỊ PHƯƠNG DUNG*,
NGUYỄN HIẾU**, NGUYỄN THỊ THƯƠNG HUYỀN***

TÓM TẮT

Đề tài tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ chì lên sự phát triển phôi cá Ngựa vằn Danio rerio*. Kết quả cho thấy, các nồng độ chì khảo sát trong nghiên cứu này chưa đủ mạnh để làm ngưỡng gây chết (LC_{50}) phôi cá Ngựa vằn. Tỉ lệ sống của phôi vẫn còn cao (88,28 – 92,81%). Tại các nồng độ chì khảo sát, nhịp tim tăng tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát, trong khi nhịp quẫy mình và tỉ lệ nở lại giảm tuyến tính.*

Từ khóa: cá Ngựa vằn, chì, kim loại nặng, ô nhiễm môi trường, phôi cá Ngựa vằn.

ABSTRACT

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

*The research measures the effect of Lead (Pb) on the zebrafish embryogenesis (*Danio rerio*). The result shows that the concentrations of Lead examined in the study are not strong enough to be the lethal concentration (LC_{50}) on zebrafish embryos. The survival rate of embryos was still quite high (88.28 – 92.81%). With the increasing of examined concentrations, the heartbeat increased linearly while the turning beat and the hatch rate decreased linearly.*

Keywords: Zebrafish, Lead, Heavy metal, environmental pollution, Zebrafish embryos.

1. Giới thiệu

Hiện nay, chì là một trong số các kim loại được liệt kê đầu tiên trong báo cáo về mức độ gây ô nhiễm của các kim loại nặng. Khi cơ thể sinh vật nói chung và con người nói riêng bị nhiễm chì thường dẫn đến các bệnh liên quan đến thần kinh [1, 3, 4, 10]. Việc đánh giá tác động của chì đến sự sống sinh vật đã và đang được nhiều nhóm nghiên cứu với các mô hình thí nghiệm khác nhau. Một trong những mô hình thường được sử dụng cho hướng nghiên cứu này là dùng các động vật thủy sinh, đặc biệt là cá Ngựa vằn (*Danio rerio*).

* ThS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM
** CN, Trường Đại học Sư phạm TPHCM
*** TS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

Bộ gen cá Ngựa vằn có độ tương đồng cao với bộ gen người; có nhiều tế bào, đặc điểm giải phẫu và sinh lí với các động vật có xương sống khác. Bên cạnh đó, chúng có kích thước nhỏ, phát triển nhanh và vòng đời ngắn nên rất lí tưởng cho các mô hình đánh giá. Đặc biệt, cá cái mỗi lần đẻ cho số lượng phôi lớn và phôi được bao bọc trong lớp vỏ trong suốt, dễ quan sát, đồng thời đây cũng là giai đoạn nhạy cảm trong vòng đời của chúng. Chính vì vậy, cá Ngựa vằn được sử dụng phổ biến trong các quy định về kiểm tra độc tính thủy sản cũng như làm chỉ thị để đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường nước [7, 8, 13]. Đề tài này được tiến hành trên mô hình phôi cá Ngựa vằn nhằm đánh giá độc tính của chì thông qua đánh giá tỉ lệ sống chết của phôi, nhịp quẫy mình, nhịp tim ở các giai đoạn: phôi nang, phôi vị, phân đốt, hình thành hầu họng; và thông qua đánh giá tỉ lệ nở của phôi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất

Môi trường Hank theo *M. Westerfield (2007)* [13] ($CaCl_2$, HCl, KCl, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, NaCl, Na_2HPO_4, $NaHCO_3$, NaOH) làm môi trường chính để pha các nồng độ Pb^{2+} và dùng cho quá trình nuôi phôi. Dung dịch Pb^{2+} (từ $Pb(NO_3)_2$) được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140µg/l.

2.2. Vật liệu

Phôi cá Ngựa vằn ở giai đoạn phôi nang (sau 3 giờ thụ tinh - 3 hour post fertilization - hpf), phôi vị (5hpf), giai đoạn phân đốt (10 - 24hpf) và giai đoạn hình thành hầu họng (24 - 48hpf) có sức sống tốt, được sử dụng cho quá trình thí nghiệm.

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 kì sáng - tối là 14 giờ sáng - 10 giờ tối tại phòng thí nghiệm.

Phương pháp phối cá và thu phôi

Tạo vách ngăn trong suốt giữa bể phối, thả cá đực và cá cái riêng biệt theo tỉ lệ 1:2, tương ứng và ổn định theo chu kì sáng tối, nhiệt độ 28-29^oC, pH duy trì từ 7,0-7,5. Cá được để trong tối 10 giờ, sau đó bật đèn và tháo vách ngăn để cá phối, sau 3-5 phút cho phối, thu phôi chuyển vào cốc thủy tinh, đếm và chọn lựa phôi tốt, đưa phôi vào bể ấp. [3, 13]

Phương pháp gây nhiễm phôi với các nồng độ Pb^{2+} khảo sát

Chọn những phôi tốt chuyển vào môi trường Hank phôi trong cốc thủy tinh với thể tích dung dịch 200mL theo các nồng độ tương ứng của Pb^{2+}: 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 µg/L và đối chứng (0 µg/L).

Sự sống phôi cá được kiểm tra qua mỗi giai đoạn phát triển (phôi nang, phôi vị, phân đốt và hầu họng) bằng quan sát hình thái dưới kính hiển vi đảo ngược. Mỗi nồng

độ có 20 phôi/đĩa ấp, và được lặp lại 4 lần. Đánh giá tỉ lệ sống của phôi qua mỗi giai đoạn phân chia.

Phương pháp đếm nhịp tim và số lần quẫy mình

Dùng máy chụp hình (Canon) quay phim lại hoạt động của các phôi, cài đặt trong 1 phút dưới kính hiển vi đảo ngược ở vật kính X10. Nhịp tim và tần số quẫy mình được đếm trong một phút, mỗi nồng độ được thực hiện ngẫu nhiên với 15/20 phôi. Thí nghiệm được lặp lại 4 lần.

Phương pháp đánh giá quá trình phôi nở (thoát nang)

Đếm số phôi đã nở trong tổng số phôi sống ở giai đoạn hầu họng (Pharyngeal), quan sát một số biến đổi bất thường của phôi làm cho phôi không nở được và xác định tỉ lệ nở của phôi. Thí nghiệm được lặp lại 4 lần.

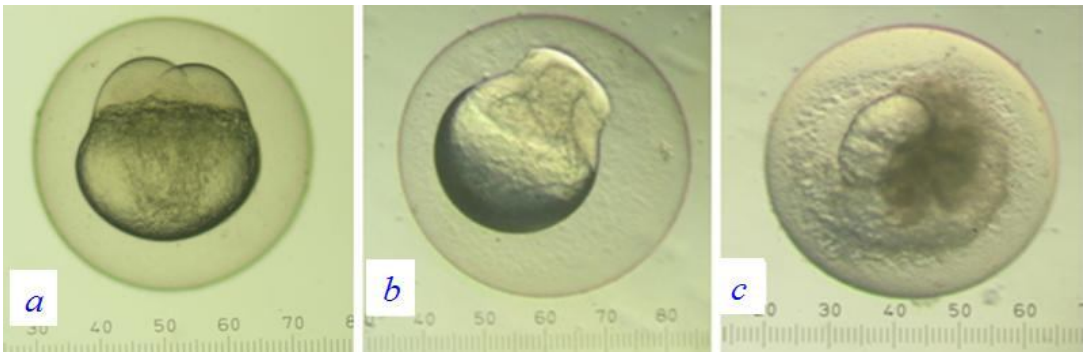
Phương pháp xử lí thống kê

Các số liệu được xử lí thống kê bằng phần mềm Minitab 16 để so sánh sự khác biệt ở tất cả các chỉ tiêu thực hiện trên các nhóm khảo sát. Độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt bằng phân tích R. Số liệu được trình bày ở dạng $\bar{x} \pm SE$ ($P \leq 0,05$).

3. Kết quả và thảo luận

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

Sau khi phân loại, đề tài thu được đa số phôi tốt, dòng sinh chất đã bắt đầu chảy bên trong phôi, cấu trúc phôi trong suốt, màng phôi nguyên vẹn, khối noãn hoàng đặc đều (hình 1a). Các giai đoạn của phôi có thể quan sát dưới kinh hiển vi một cách rõ ràng. Ngoài những phôi phát triển bình thường về cấu trúc phôi bì, vẫn có những phôi phát triển bất thường (hình 1b) và những phôi chết (hình 1c). Những phôi chết quan sát dưới kính hiển vi điện tử có cấu trúc bên trong bị biến dạng hoàn toàn, cấu trúc phôi trở nên đen, dòng sinh chất trong phôi ngừng chảy.



Hình 1. *Hình thái phát triển của phôi (X20)* - Thước đo: 500µm

a: Phôi phát triển bình thường (2 tế bào); b: Phôi phát triển bất thường; c: Phôi chết

Những phôi phát triển không bình thường, dòng sinh chất trong phôi vẫn chảy, phôi phân chia bất thường, không tuân theo quy luật phân chia của phôi theo thời gian, dẫn đến không hình thành được cơ quan bộ phận hay vẫn hình thành được các cơ quan nhưng các cơ quan lại bị khiếm khuyết. Các phôi bị dị dạng mức độ nhẹ thì vẫn có thể tồn tại đến giai đoạn sau thoát nang (nở), các phôi dị dạng mức độ nặng có thể dẫn đến chết. Các phôi này không vượt qua được giai đoạn phát triển về sau, các phôi chết do không hình thành được các cơ quan hay hình thành các cơ quan khiếm khuyết không thực hiện được chức năng của chúng. 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 (%) trung bình phôi sống qua các giai đoạn phát triển ở các nồng độ khảo sát*

Giai đoạn	Tỉ lệ (%) phôi sống ở các nồng độ Pb^{2+} gây nhiễm								Trung bình
	ĐC	20µg/L	40µg/L	60µg/L	80µg/L	100µg/L	120µg/L	140µg/L	
Phôi nang	98,75 ± 1,24	98,75 ± 1,24	97,50 ± 1,75	97,50 ± 1,75	98,75 ± 1,24	97,50 ± 1,75	97,50 ± 1,75	96,25 ± 2,12	88,28 ± 1,27[a]
Phôi vị	93,75 ± 2,71	92,50 ± 2,94	93,75 ± 2,71	97,50 ± 1,75	88,75 ± 3,53	93,75 ± 2,71	92,50 ± 2,94	90,00 ± 3,35	92,81 ± 1,02[b]
Phân đốt	91,25 ± 3,16	88,75 ± 3,53	91,25 ± 3,16	85,00 ± 3,99	88,75 ± 3,53	88,75 ± 3,53	88,75 ± 3,53	83,75 ± 4,12	88,28 ± 1,27[a]
Hầu họng	93,75 ± 2,71	82,50 ± 4,25	86,25 ± 3,85	90,00 ± 3,35	91,25 ± 3,16	92,50 ± 2,94	85,00 ± 3,99	86,25 ± 3,85	88,44 ± 1,26[ab]
a, b: thể hiện sự khác biệt nhau theo cột ở độ tin cậy 95%									

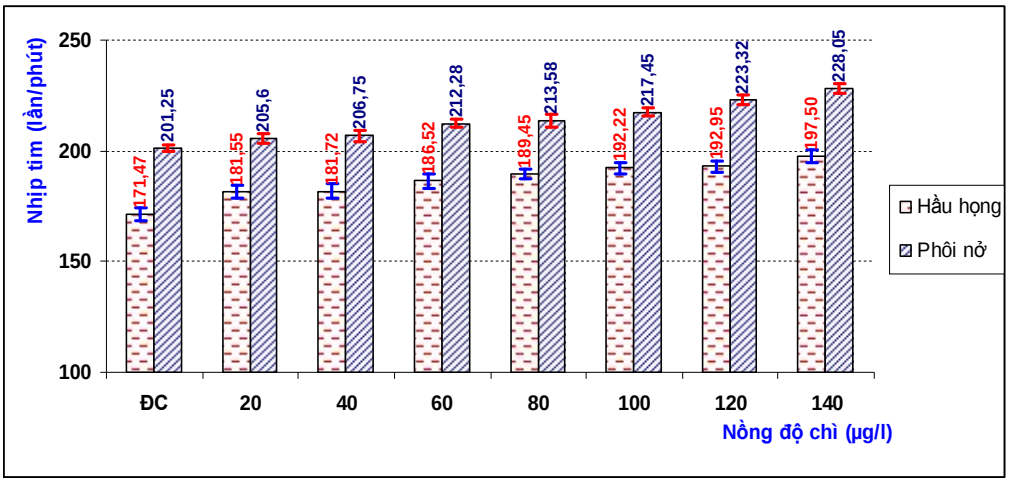
Kết quả bảng 1 cho thấy, tỉ lệ phôi sống ở các lô thí nghiệm đều đạt từ 82,5% trở lên, biến động từ 82,5 - 98,75% ($p > 0,05$). Như vậy, các nồng độ chì khảo sát chưa phải là ngưỡng gây chết LC_{50} (lethal concentration) đối với phôi cá. Ở các giai đoạn phát triển, tỉ lệ phôi sống của lô đối chứng cao hơn các lô thí nghiệm, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Nguyên nhân có thể do trong giai đoạn này phôi được bảo vệ bởi lớp vỏ dày, làm hạn chế sự xâm nhập và gây hại của chì; có thể nồng độ chì gây nhiễm xâm nhập vào phôi chưa đủ lớn để gây ra rối loạn các quá trình chuyển hóa và quá trình hình thành cơ quan bộ phận, nên không gây chết phôi cá với số lượng lớn [2, 7, 13]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Long Yong và cộng sự (2011) [9] cho thấy, trong các giai đoạn phát triển của phôi cá Ngựa vằn có sự hiện diện của gen *abcc2* - có vai trò quan trọng trong việc chống lại các kim loại nặng (Cd, Hg, Pb). [9]

Phôi được đưa vào môi trường Hank có bổ sung các nồng độ Pb^{2+}, tỉ lệ phôi sống trung bình tại các giai đoạn phôi nang (88,28 ± 1,27%), phân đốt (88,28 ± 1,27%), hầu họng (88,44 ± 1,26%) khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên, ở giai đoạn phôi vị, tỉ lệ phôi sống cao hơn các giai đoạn còn lại ($p < 0,05$).

Tại giai đoạn phôi nang, tỉ lệ phôi sống là 88,28 ± 1,27%, nhưng ở giai đoạn phôi vị, tỉ lệ sống đạt 92,81 ± 1,02%, cao hơn giai đoạn phôi nang 4,53 % ($p < 0,05$). Kết quả này có thể do trước và trong giai đoạn phôi nang có những tác động cơ học vào phôi như: khi chuyển phôi sang môi trường Hank, chuyển phôi lên kính hiển vi để quan sát và đánh giá, chúng tôi sử dụng pipette để hút phôi, có thể những thao tác này đã tác động lên phôi gây nên những tổn thương và làm chết phôi. Từ giai đoạn phôi vị sang giai đoạn phân đốt, tỉ lệ phôi sống giảm 4,53% ($p < 0,05$). Theo nghiên cứu của Charles và cộng sự (1995) [2], ở cuối giai đoạn phôi vị, bắt đầu sang giai đoạn phân đốt có sự biệt hóa tế bào và hình thành nên một số cơ quan, do đó, giai đoạn này dễ xảy ra những biến đổi cấu trúc bên trong. Đồng thời tại giai đoạn này chì cũng đã xâm nhập vào phôi với một số lượng nhất định, nên cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi. Ở giai đoạn hình thành hầu họng, tỉ lệ phôi sống đạt 88,44 ± 1,26%, số lượng phôi chết giảm 0,16% so với giai đoạn phân đốt, tuy nhiên, vẫn thấp hơn giai đoạn phôi vị ($p < 0,05$). Giai đoạn hình thành hầu họng, tỉ lệ sống của phôi không khác biệt so với giai đoạn phân đốt (88,44% so với 88,28%, tương ứng, $p > 0,05$). Ở giai đoạn này vẫn đang diễn ra sự hoàn thiện các cấu trúc bên trong phôi; đồng thời việc quan sát phôi dưới kính hiển vi với tác động trực tiếp bởi ánh sáng của đèn ở kính vẫn tác động lên phôi làm phôi chết. [2, 13]

3.2. Ảnh hưởng chì lên hoạt động hoạt động sinh lí của phôi

3.2.1. Ảnh hưởng chì lên nhịp tim

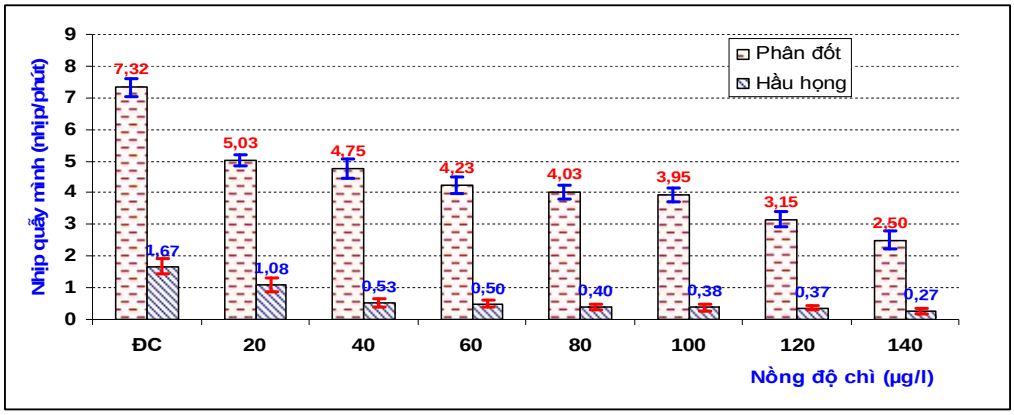


Hình 2. *Biểu đồ thể hiện nhịp tim của phôi ở giai đoạn hầu họng và giai đoạn phôi nở tại các nồng độ Pb^{2+} khảo sát*

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 Pb^{2+}. Đối với giai đoạn hầu họng, nhịp tim của phôi được gây nhiễm Pb^{2+} ở các nồng độ 20, 40, 60, 80, 100 và 140 µg/L tăng lên từ 10 ÷ 26 nhịp/phút so với nhịp tim của các phôi ở lô đối chứng (181; 181; 186; 189; 192 và 197 nhịp so với 171 nhịp, $p < 0,05$, tương ứng). Đồng thời, ở giai đoạn phôi nở, nhịp tim của các phôi được gây nhiễm ở nồng độ Pb^{2+} 140µg/L đạt giá trị cao nhất (228 nhịp/phút), tăng lên 27 nhịp/phút ($p < 0,05$) so với lô đối chứng. Như vậy, với lượng tích tụ Pb^{2+} càng lớn sẽ làm nhịp tim của phôi càng tăng.

Kết quả ở hình 2 cũng cho thấy nhịp tim phôi ở giai đoạn phôi nở có sự tăng lên đồng loạt so với nhịp tim của các phôi ở giai đoạn hầu họng ($p < 0,01$). Nguyên nhân có thể là do: (i) phôi ở giai đoạn hầu họng được bảo vệ bởi lớp màng đệm bên ngoài nên làm giảm đáng kể áp lực nước lên phần cấu trúc phôi bên trong, do đó, cơ không cần hoạt động nhiều để chống lại áp lực nước từ bên ngoài; (ii) đến giai đoạn nở, không còn màng đệm bảo vệ, cá bắt đầu hoàn thiện vây ngực, khả năng vận động tăng, làm tăng hoạt động tuần hoàn. Ngoài ra, có thể khi bị stress bởi tác nhân Pb^{2+}, nhịp tim cũng tăng lên [2, 7, 13]. Theo nghiên cứu của Hallare và cộng sự (2005) [5], 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; 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 nở tăng cao hơn so với giai đoạn hầu họng.

3.2.2. Ảnh hưởng chì lên hoạt động quẫy mình



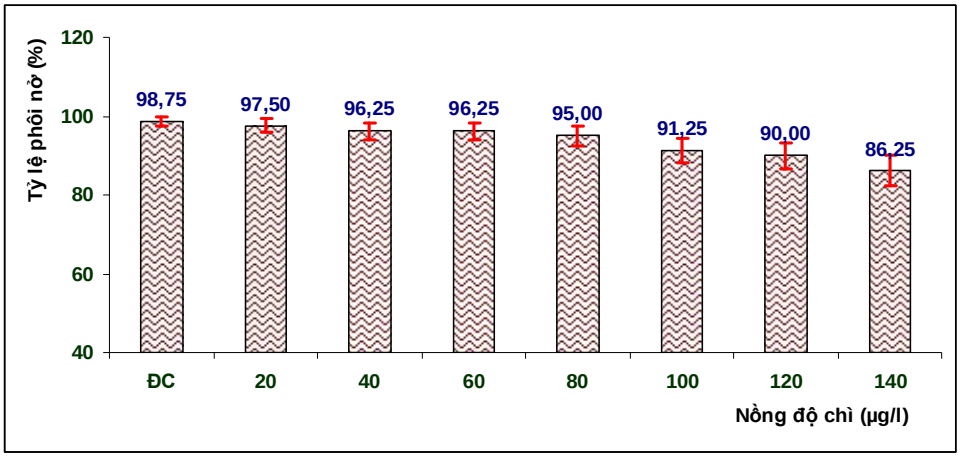
Hình 3. *Biểu đồ thể hiện nhịp quẫy mình của phôi giai đoạn phân đốt và hầu họng ở các nồng độ Pb^{2+} khảo sát*

Ở giai đoạn phân đốt và hầu họng, nhịp quẫy mình trung bình của phôi lô đối chứng cao hơn hẳn so với các lô thí nghiệm ($p < 0,05$) và nhịp quẫy mình giảm tuyến tính theo sự tăng dần các nồng độ Pb^{2+} khảo sát. Cụ thể, khi các phôi được gây nhiễm trong các nồng độ Pb^{2+} càng cao thì tần số quẫy mình càng thấp. Trong giai đoạn phân

đốt, hệ thần kinh bắt đầu hình thành và sang giai đoạn hầu họng, hệ thần kinh ngày càng hoàn thiện hơn [3, 8, 13]. Theo Samuel và cộng sự (2010) [11], chì gây chết tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm, làm cho sự vận động của phôi trở nên chậm và kém linh hoạt hơn. [7]

Số nhịp quẫy mình ở giai đoạn phân đốt (2,5 - 7,32 nhịp/phút), ở giai đoạn hầu họng (0,27 - 1,67 nhịp/phút), sự khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Khi bước vào giai đoạn hình thành hầu họng, hoạt động quẫy mình của phôi cá giảm so với giai đoạn phân đốt và nhịp quẫy mình cũng giảm theo sự tăng nồng độ Pb^{2+} gây nhiễm. Điều này có thể giải thích như sau: từ giai đoạn phân đốt phôi đã có thể quẫy mình hoạt động, sang giai đoạn hầu họng kích thước phôi lớn nên lúc này phôi vận động khó hơn, khi phát triển đến một kích thước mà lớp vỏ phôi không thể dãn ra thì phôi không thể cử động trong lớp vỏ phôi và lúc này đến giai đoạn nở để phôi thoát ra ngoài. [8, 13]

3.2.3. Ảnh hưởng chì lên hoạt động nở của phôi

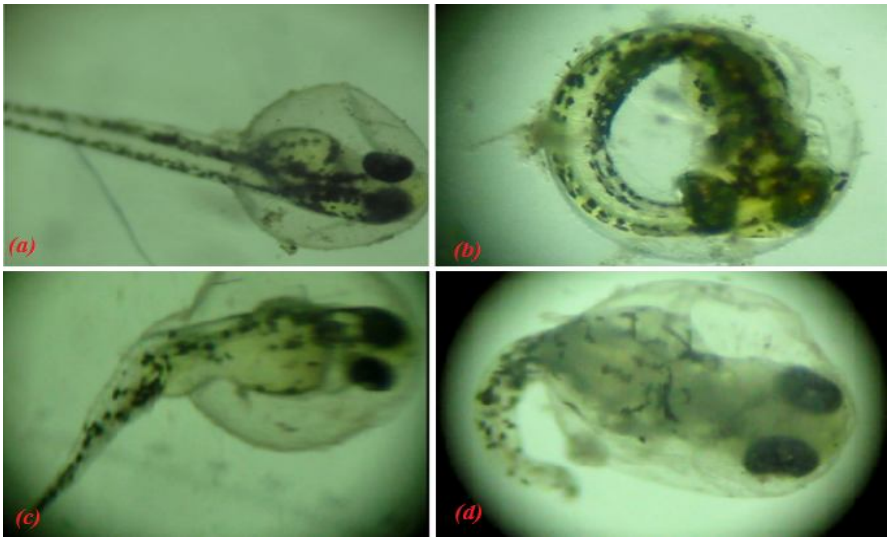


Hình 4. *Biểu đồ thể hiện tỉ lệ (%) trung bình phôi nở ở các nồng độ Pb^{2+} khảo sát*

Biểu đồ hình 4 cho thấy tỉ lệ nở trung bình của phôi ở lô đối chứng là 98,75%. Tuy nhiên, ảnh hưởng của Pb^{2+} làm giảm tỉ lệ nở của phôi, khi phôi được gây nhiễm với nồng độ càng cao, tỉ lệ nở của chúng càng giảm xuống, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê giữa hai nồng độ khảo sát kế cận nhau ($p > 0,05$). Tỉ lệ nở của phôi ở các nồng độ 100 µg/L, 120 µg/L và 140 µg/L thấp hơn so với lô đối chứng là 7,5%; 8,74% và 12,5%, tương ứng và sự khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Bên cạnh đó, tỉ lệ nở nồng độ 140 µg/L cũng thấp hơn so với ở nồng độ 20, 40 và 60µg/L từ 10 - 11% ($p < 0,05$). Như vậy, tỉ lệ nở của phôi giảm mạnh nhất ở nồng độ 140µg/L so với phôi ở lô đối chứng, cụ thể là từ 98,75% giảm 12,5% so với 86,25%, tương ứng.

Như vậy, Pb^{2+} khi tích lũy bên trong phôi gây ảnh hưởng đến hệ cơ và làm giảm hoạt động quẫy mình, từ đó làm giảm những tác động từ bên trong phôi, kết quả làm giảm tốc độ và tỉ lệ nở của phôi. Phôi cá Ngựa vằn khi bị phơi nhiễm Pb^{2+} gây ra dị

dạng các cơ quan và sự biểu hiện sai lệch các gene có liên quan đến điều hòa quá trình phát triển [3, 10]. Mặt khác, qua quan sát hình thái, chúng tôi nhận thấy cá bị các dị tật: cong vẹo cột sống, cong đuôi, cơ thể ngắn lại (hình 5) khi được phơi nhiễm ở các nồng độ Pb^{2+} khảo sát. Nguyên nhân do trong quá trình phát triển đến giai đoạn nở, phôi cá Ngựa vằn đã tiết ra enzyme để phá vỡ lớp màng đệm (chorion) của phôi. Lúc này, lớp màng đệm của phôi liên kết với các mucopolysaccharide trên màng phôi để tăng sự bền vững, từ đó làm chậm quá trình nở. Nếu phôi cá nằm quá lâu trong lớp vỏ sẽ làm dị tật cong vẹo cột sống ở các giai đoạn sau hay chết trong lớp vỏ phôi [8, 13]. Đây cũng là một trong những nguyên nhân làm tăng tỉ lệ chết trong giai đoạn này.



Hình 5. *Một số bất thường giai đoạn phôi nở (X20) – Thước đo: 500µm*

(a): phôi nở bình thường; (b): phôi không nở được;
(c): phôi bị cong cột sống sau khi nở; (d): phôi bị cong cột sống và đuôi sau khi nở

Tóm lại, Pb^{2+} xâm nhập vào trong phôi gây ra những tác động nhất định lên sự phát triển phôi. Sự hiện diện của chì trong nhân tế bào có thể dẫn đến tác dụng phụ trên chức năng của gene, nếu Pb^{2+} ở nồng độ thấp có khả năng có tác dụng có hại trên các protein điều hòa gen (Hanas và cộng sự, 1999) [6]. Chì gây ảnh hưởng đến hệ cơ như làm giảm hoạt động quẫy mình của phôi, ảnh hưởng đến hệ tuần hoàn như làm tăng nhịp tim để tăng cường sự trao đổi chất và ảnh hưởng đến quá trình nở của phôi (làm phôi chậm hay không nở dẫn đến tăng dị tật và gây chết phôi). [3, 10, 12]

Hiện nay trên thế giới và Việt Nam có nhiều công trình nghiên cứu về sự phát triển của cá Ngựa vằn và những ảnh hưởng của độc chất lên sự phát triển của chúng. Tuy nhiên, chưa có công trình nào nghiên cứu về sự ảnh hưởng của chì lên sự sống và các hoạt động sinh lí của phôi cá Ngựa vằn trong các giai đoạn phát triển một cách tổng thể. Nghiên cứu này là một trong những nghiên cứu cơ bản để làm tiền để cho nhưng nghiên cứu tiếp theo về sự tác động của kim loại nặng trên cá Ngựa vằn.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy phôi cá Ngựa vằn khi bị phơi nhiễm chì trong các nồng độ khảo sát vẫn cho tỉ lệ sống cao (82,5 – 92,5%). Trong các nồng độ chì khảo sát, chưa có nồng độ nào là ngưỡng gây chết LC_{50} của phôi cá Ngựa vằn. Tỉ lệ sống của phôi thấp nhất tại giai đoạn hầu họng, ở nồng độ 20µg/L (đạt 82,50 ± 4,25%); nhịp tim giai đoạn hầu họng và giai đoạn phôi nở tăng tuyến tính theo thứ tự tăng dần các nồng độ khảo sát; nhịp quẫy mình bị ảnh hưởng tại giai đoạn hầu họng nhiều nhất (giảm tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát); tỉ lệ nở của phôi giảm tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát, thấp nhất tại nồng độ 140µg/L (đạt 86,25 ± 3,85%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Huy Bá (2006), *Độc học môi trường*, Tập II, Nxb Đại học Quốc gia TPHCM, chương 0, trang 05-38 và chương V, trang 231-290.
2. Charles B.K., W.W.B., Seth R.K., Bonnie U., and Thomas F.S. (1995), "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish", *Developmental dynamics*, 203: pp. 253-310.
3. Dou C., Z.J. (2011), "Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development", *J Hazard Mater*, 194: pp. 277-82.
4. Ebrahimi, M. and M. Taherianfard (2010), "Concentration of four heavy metals (cadmium, lead, mercury, and arsenic) in organs of two cyprinid fish (*Cyprinus carpio* and *Capoeta sp.*) from the Kor River (Iran)", *Environ Monit Assess*, 168(1-4): pp.575-85.
5. Hallare A.V., Schirlinga M., Luckenbacha T., Kohler H.R., and T. R. (2005), "Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos", *Journal of Thermal Biology*, 30(7-17).
6. Hanas, J.S., J.S. Rodgers, J.A. Bantle, and Y.G. Cheng (1999), "Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2)His(2) zinc finger proteins", *Mol Pharmacol*, 56(5): pp.982-8.
7. Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, and T.F. Schilling (1995), "Stages of embryonic development of the zebrafish", *Dev Dyn*, 203(3): pp.253-310.
8. Lawrence, C. (2007), "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review", *Aquaculture*, 269: pp.1-20.

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): pp.381-91.
10. Rice C., G.J.K., Zalewski K., Weber D. N. (2011), "Developmental lead exposure causes startle response deficits in zebrafish", *Aquat Toxicol*, 105(3-4): pp.600-8.
11. Stegeman J.J., Gondstone J.V., and Hahn M.E. (2010), "Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology", *In Zebrafish (S.F. Perry, M. Ekker, A.P. Farrell, C.J. Brauner) Elsevier*: pp.368-375.
12. Truong L., M.I.S., Stankus D. P., Nason J. A., Lonergan M. C., Tanguay R. L. (2010), "Differential stability of lead sulfide nanoparticles influences biological responses in embryonic zebrafish", *Arch Toxicol*, 85(7): pp.787-98.
13. Westerfield M. (2007), *The zebrafish book*, 5th ed, A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press. Paperback.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 18-7-2014; ngày phản biện đánh giá: 04-8-2014; ngày chấp nhận đăng: 20-8-2014)