



KHẢO SÁT SỰ TÁC ĐỘNG CỦA ION ĐỒNG (Cu^{2+}) LÊN CÁC HOẠT ĐỘNG SINH LÝ TRONG GIAI ĐOẠN PHÔI CÁ NGỰA VẪN – *Danio rerio* HAMILTON, 1822

Trần Thị Phương Dung*, Trần La Giang

Khoa Sinh học – Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 26-6-2018; ngày nhận bài sửa: 17-7-2018; ngày duyệt đăng: 21-9-2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá tác động của ion đồng (Cu^{2+}) ở các nồng độ $0\ \mu\text{g/L}$; $500\ \mu\text{g/L}$; $1000\ \mu\text{g/L}$; $2000\ \mu\text{g/L}$ lên các hoạt động sinh lý trong giai đoạn phôi của cá Ngựa vằn (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Kết quả nghiên cứu cho thấy, các nồng độ Cu^{2+} khảo sát đã làm thay đổi hoạt động sinh lý quấy mình của phôi cá, nhưng khi nồng độ đồng càng cao lại làm tăng nhịp tim cá ở giai đoạn hầu họng và thoát nang và làm tăng thời gian thoát nang của phôi cá.

Từ khóa: ion đồng (Cu^{2+}), nhiễm độc kim loại nặng, cá ấu trùng, phôi cá Ngựa vằn.

ABSTRACTS

*Surveying the influences of the copper ion (Cu^{2+}) on physiological activities of Zebrafish embryos – *Danio rerio* Hamilton, 1822*

The research estimated influences of the copper ion (Cu^{2+}) at concentrations of $0\ \mu\text{g/L}$; $500\ \mu\text{g/L}$; $1000\ \mu\text{g/L}$; $2000\ \mu\text{g/L}$ on physiological activities of Zebrafish embryos during the embryogenesis. The result shows that the higher concentrations of Cu^{2+} not only changed the swelling activity of fish embryos but also increased heart rate during pharyngeal, hatching stage and increased embryogenesis duration.

Keywords: ion copper (Cu^{2+}), poisoned by heavy metal, larval fish, Zebrafish' embryo.

1. Mở đầu

Hiện nay, với sự phát triển mạnh mẽ của nền công nghiệp đã dẫn đến sự ô nhiễm môi trường thủy sinh ngày càng cao. Trong những tác nhân ảnh hưởng tới môi trường thủy sinh và gây ảnh hưởng trực tiếp tới các động vật sống trong môi trường này là các hợp chất kim loại nặng. Kim loại nặng hiện diện và tích tụ ở nhiều nồng độ khác nhau và có tính bền vững cao [1]. Một trong những kim loại nặng gây ô nhiễm trong môi trường nước hiện nay chính là ion đồng (Cu^{2+}). Ở Việt Nam, các nghiên cứu về độc chất đang tiến hành tập trung về kim loại nặng trong môi trường nước nhằm thử nghiệm độc tính của kim loại nặng đối với sự phát triển của cá; từ đó, đưa ra kiến nghị để đánh giá nồng độ độc chất tối đa có thể chấp nhận được cho động vật ở dưới nước và cung cấp dữ liệu cho việc thiết lập tiêu chuẩn chất lượng nước hiện nay [1]. Ngoài việc quan trắc ô nhiễm

* Email: tpdung2007@gmail.com

kim loại nặng trực tiếp bằng các phương pháp lí hóa, thì việc sử dụng các thủy sinh vật chỉ thị, cụ thể là cá Ngựa vằn (*Danio rerio* Hamilton, 1822), loài cá nước ngọt được coi là mô hình động vật có xương sống nổi bật trong các nghiên cứu về di truyền, sinh lí và sự phát triển bệnh lí, là một mô hình *in vivo* khá phổ biến trong nghiên cứu khoa học và mang lại nhiều ý nghĩa cho thực tiễn [7], [12]. Nghiên cứu này chỉ ra được, sự ảnh hưởng của ion đồng (Cu^{2+}) lên các hoạt động sinh lí như hoạt động quấy mình, nhịp đập của tim và hoạt động thoát nang của phôi cá Ngựa vằn.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Hóa chất

Môi trường Hank dành cho phôi gồm các muối CaCl_2 , HCl , KCl , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , NaOH làm môi trường chính dùng cho quá trình nuôi phôi (M. Westerfield, 2007). Dung dịch Cu^{2+} (từ CuSO_4) được chuẩn bị ở thể pha các nồng độ Cu^{2+} các nồng độ khác nhau: 0, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/l}$.

2.2. Vật liệu

Phôi cá Ngựa vằn ở giai đoạn phôi (giai đoạn phân đốt (10 - 24hpf - hours post fertilization, giờ sau thụ tinh) và giai đoạn hình thành hầu họng (24 - 48 hpf)) và giai đoạn thoát nang (48 - 72 hpf) 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 với 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°C, pH từ 7,0 - 7,5. Cá được đẻ trong tối 10 giờ, sau đó bật đèn và tháo vách ngăn để cá giao 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.

- Phương pháp phơi nhiễm phôi với các nồng độ Cu^{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 Cu^{2+} : 500; 1000; 2000 $\mu\text{g/L}$; và đối chứng (0 $\mu\text{g/L}$).

- Phương pháp đếm nhịp tim và số lần quấy 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 quấy mình được đếm trong một phút, mỗi nồng độ được thực hiện ngẫu nhiên với 20/30 phôi. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

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

Đếm số phôi đã nở trong tổng số phôi sống (20 phôi) ở giai đoạn hầu họng (pharyngeal) chuyển sang giai đoạn thoát nang (hatching), quan sát một số biến đổi bất

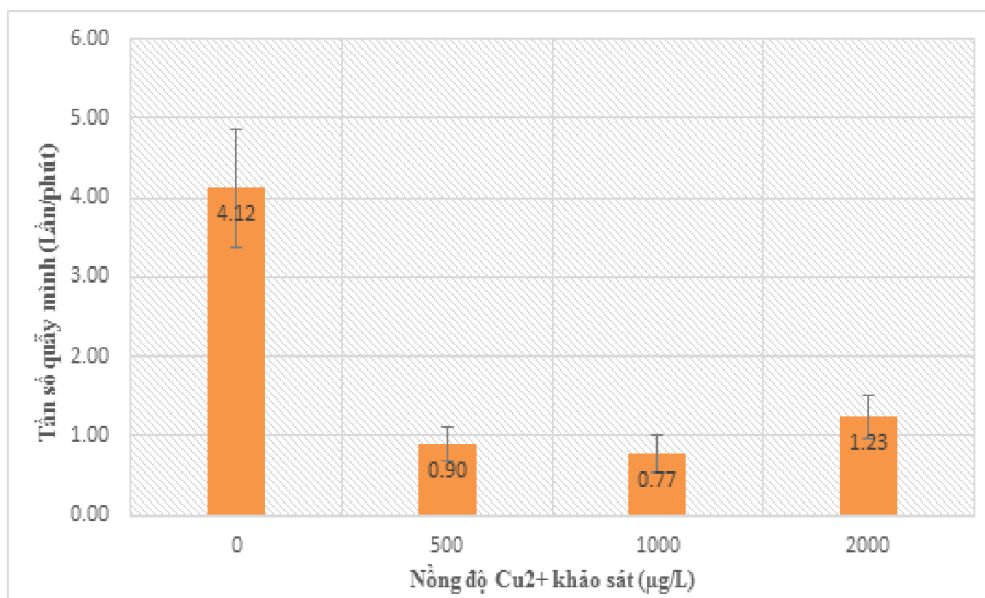
thường của phôi làm cho phôi không nở được và xác định tỉ lệ nở của phôi. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- *Phương pháp xử lý thống kê*

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

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của ion đồng lên hoạt động quấy mình của phôi



Hình 1. Biểu đồ tần số quấy mình của phôi giai đoạn phân đốt ở các nồng độ khảo sát

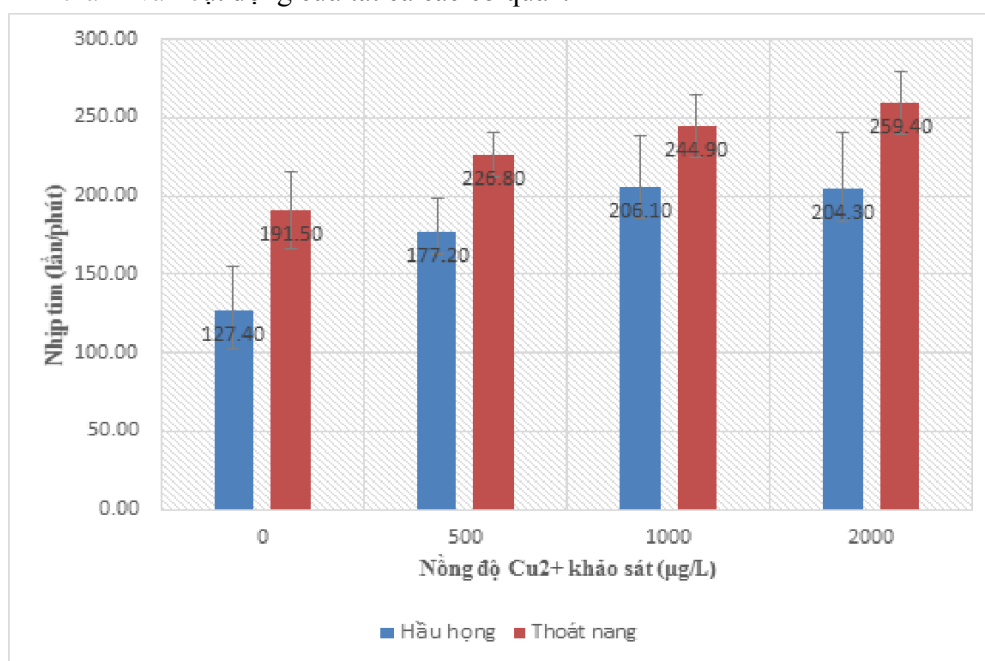
Bắt đầu từ 10 giờ đến 24hpf phôi bước vào giai đoạn phân đốt, ở giai đoạn này đã bắt đầu hình thành các đốt sống, chồi đuôi nhô lên và kéo dài. Đây là giai đoạn có nhiều biến đổi về hình thái cơ thể, mầm móng từng bộ phận cơ thể bắt đầu được hình thành, lúc này cũng là lúc phôi bắt đầu hoạt động quấy mình [3]. Hoạt động quấy mình của phôi kéo dài từ giai đoạn phân đốt đến giai đoạn hậu hộng biểu hiện hoạt động của hệ cơ góp phần làm rách lớp vỏ phôi làm phôi thoát nang ra ngoài và chuyển sang giai đoạn cá ấu trùng [3], [13].

Kết quả nghiên cứu hoạt động quấy mình giai đoạn hậu hộng cho thấy: Tại nghiệm thức đối chứng có tần số quấy mình cao hơn nghiệm thức có nồng độ ion đồng 500, 1000, 2000 µg/L lần lượt là 3,283 nhíp/phút; 3,417 nhíp/phút; 2,950 nhíp/phút với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nhóm khảo sát ($P < 0,05$). Các lô thí nghiệm đều có tần số quấy mình giảm tuyến tính theo thứ tự các nồng độ nhiễm ion đồng tăng dần từ 0 µg/L đến 1000 µg/L ($P < 0,05$). Tuy nhiên, tại nồng độ gây nhiễm ion đồng cao nhất 2000 µg/L tần số quấy mình trung bình của phôi $1,23 \pm 0,247$ nhíp/phút cao hơn nồng độ 1000 µg/L tuy nhiên sự

khác biệt giữa các nồng độ này không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Điều này chứng tỏ ion đồng có tác động đến hoạt động quấy mình của cá Ngựa vằn ở giai đoạn phôi, nguyên nhân có thể là ion đồng xâm nhập vào phôi gây nên một số biến dạng ở phôi như dị tật phần đuôi và xương sống phôi cá Ngựa vằn làm phôi cá không thể hoạt động được bình thường (Zhang, 2013).

3.2. Ảnh hưởng của ion đồng lên nhịp tim của phôi

Hệ tuần hoàn xuất hiện như một trong những cơ quan đầu tiên trong quá trình phát triển phôi thai của cá Ngựa vằn và phát triển hình thái cho đến khi trưởng thành. Các mạch máu được hình thành cùng với sự phát triển của phôi và có vai trò quan trọng trong quá trình hình thành và hoạt động của tất cả các cơ quan.



Hình 2. Biểu đồ nhịp tim của cá ở giai đoạn hầu hộng và giai đoạn thoát nang tại các nồng độ Cu²⁺ khảo sát

Cuối giai đoạn hầu hộng có thể thấy rõ động mạch chủ và động mạch đuôi qua kính hiển vi. Sau khi thoát nang, hệ tuần hoàn cá tiếp tục hoàn thiện, máu lưu thông khắp cơ thể để cung cấp oxy và chất dinh dưỡng đến các cơ quan. Theo nghiên cứu của Jezierska *et al.*, (2002) về ảnh hưởng của kim loại này trên cá chép *Cyprinus carpio*, nhịp tim là thông số quan trọng trong đánh giá stress ở thủy sinh vật và là một tham số quan trọng cho chức năng tim có liên quan đến độc tính trên tim [2]. Do cá Ngựa vằn là một loài thuộc họ cá Chép nên thí nghiệm khảo sát nhịp tim của phôi để đánh giá sự tác động của Cu²⁺ lên quá trình chuyển hóa trong phôi cá Ngựa vằn được tiến hành.

Phôi cá sau khi được phơi nhiễm bởi Cu²⁺, Cu²⁺ sẽ xâm nhập vào trong tế bào của phôi, tích lũy gây ảnh hưởng nhất định lên hoạt động của các cơ quan, trong đó có tim [5].

Kết quả được thể hiện trên Hình 2 cho thấy: Nhịp tim ở giai đoạn hầu hống của cá Ngựa vằn (127,40 - 206,10 lần/phút) thấp hơn ở giai đoạn thoát nang (191,50 - 259,40 nhịp/phút). Trong hai giai đoạn hầu hống và thoát nang nhịp tim tăng tuyến tính theo các nồng độ Cu^{2+} khảo sát ($P < 0,05$);

Nguyên nhân có thể được giải thích như sau:

Trong giai đoạn hầu hống cơ thể cá còn đang phát triển và chưa hoàn thiện các cơ quan, kể cả tim. Đến giai đoạn thoát nang các bộ phận của cá trong đó có hệ tuần hoàn đã dần dần hoàn thiện nên nhịp tim tăng lên. Tại giai đoạn thoát nang, vây ngực đã hình thành, lúc này cá bắt đầu bơi, sự vận động của cá kéo theo nhu cầu cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cũng tăng lên, khi đó tim phải hoạt động nhiều để đáp ứng nhu cầu của cơ thể.

Phôi tại giai đoạn hầu hống vẫn ở trong lớp màng đệm, lớp màng này bao bọc và bảo vệ hạn chế sự tác động của áp lực nước lên các hệ cơ quan bên trong phôi. Do đó, cơ không cần hoạt động nhiều để chống lại áp lực nước từ bên ngoài tác động vào. Trái lại, khi phôi thoát nang ra ngoài thành cá ấu trùng thì áp lực nước tác động trực tiếp lên cá ấu trùng, dẫn đến tăng hoạt động tuần hoàn cũng là một trong những nguyên nhân làm tăng nhịp tim từ giai đoạn hầu hống sang giai đoạn thoát nang của cá.

Đồng là một trong những kim loại nặng gây độc cho hệ tuần hoàn với nồng độ cao. Trong phôi có lớp màng bao bọc, sự tác động của Cu^{2+} sẽ thấp hơn so với sự xâm nhập trực tiếp vào cơ thể cá khi cá thoát nang. Trong giai đoạn cá thoát nang sự trao đổi chất tăng lên để đáp ứng sự thay đổi môi trường từ trong phôi ra ngoài và phản ứng với các chất độc hại như Cu^{2+} .

Nhịp tim của phôi cá Ngựa vằn ở giai đoạn hầu hống có sự tăng tuyến tính theo sự tăng các nồng độ Cu^{2+} khảo sát lần lượt là $127,4 \pm 3,564$ lần/phút, nồng độ $500 \mu\text{g/L}$ là $177,20 \pm 2,796$ lần/phút, nồng độ $1000 \mu\text{g/L}$ là $206,1 \pm 4,187$ lần/phút, nồng độ $2000 \mu\text{g/L}$ là $204,30 \pm 4,759$ lần/phút. Nhịp tim ở nghiệm thức đối chứng là $127,4 \pm 3,564$ lần/phút so với nồng độ $500 \mu\text{g/L}$ là $177,20 \pm 2,796$ lần/phút thấp hơn 49,8 lần/phút; Nhịp tim ở nồng độ $500 \mu\text{g/L}$ so với nồng độ $1000 \mu\text{g/L}$ là $206,1 \pm 4,187$ lần/phút ($P < 0,05$) thấp hơn 28,9 lần/phút ($P < 0,05$). So sánh giữa nồng độ $1000 \mu\text{g/L}$ và $2000 \mu\text{g/L}$, nhịp tim ở nồng độ $2000 \mu\text{g/L}$ thấp hơn 1,8 lần/phút, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$). Trong giai đoạn thoát nang, tại các nồng độ Cu^{2+} gây nhiễm nhịp tim tăng tuyến tính theo sự gia tăng của nồng độ khảo sát tăng từ 35,3 - 67,9 lần/phút ($P < 0,05$). Nhịp tim ở nghiệm thức đối chứng có sự khác biệt về mặt thống kê so với các nồng độ gây nhiễm khảo sát ($P < 0,05$).

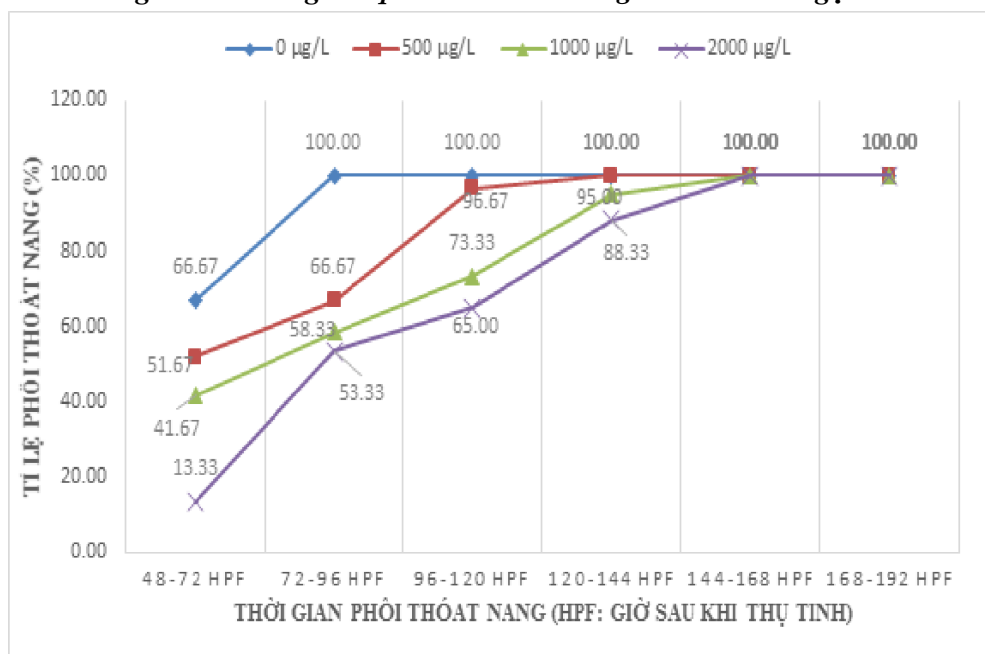
Có thể giải thích kết quả nghiên cứu như sau:

Một trong những cơ chế gây độc chủ yếu của Cu^{2+} là sự gián đoạn các quá trình ion hoá, điển hình là sự ức chế Na, K-ATPase (một protein màng không thể thiếu trong việc vận chuyển Na^+ và K^+ qua màng sinh chất để thẩm thấu và khuếch tán qua màng tế bào

[8], [11], [14]. Tăng nồng độ Na^+ trong tế bào, ức chế hoạt tính của chất trao đổi $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, làm tăng nồng độ Ca^{2+} nội bào làm tăng cường độ co bóp tim [4], [6], [8].

Khi nồng độ Cu^{2+} tăng lên dẫn đến sự tăng apoptosis, tương ứng với sự suy giảm hoạt tính Na, K-ATPase và nồng độ Na^+ (Li và Cs, 1998) [9]. Ảnh hưởng của Cu^{2+} như một chất ức chế hoạt tính Na, K-ATPase, sẽ dẫn đến sự tăng nhịp tim [10].

3.2. Ảnh hưởng của ion đồng lên quá trình thoát nang của Phôi cá Ngựa vằn



Hình 3. Tỷ lệ % phôi thoát nang tại các nồng độ Cu^{2+} khảo sát theo thời gian

Biểu đồ Hình 3 cho thấy trong giai đoạn thoát nang (48-72hpf) thì tỷ lệ thoát nang trung bình của phôi cao nhất ở lô đối chứng là 66,67% và giảm lần lượt tại các lô có nồng độ Cu^{2+} 500 µg/L (51,67%); 1000 µg/L (41,67%); 2000 µg/L (13,33%). Tại lô đối chứng thời gian để toàn bộ phôi thoát nang là 72 - 96h, còn ở nồng độ Cu^{2+} tương ứng 500 µg/L thì là 120 - 144 hpf, còn ở nồng độ 1000 µg/L và 2000 µg/L là sau 144 - 168 hpf. Nồng độ Cu^{2+} càng cao càng làm giảm tỷ lệ thoát nang ở phôi cá Ngựa vằn và kéo dài thời gian phôi thoát nang.

Nguyên nhân có thể giải thích như sau:

Khi Cu^{2+} tích lũy bên trong phôi gây ảnh hưởng đến hệ cơ và làm giảm hoạt động quấy mình, từ đó làm giảm những hoạt động từ bên trong phôi, kết quả làm giảm tốc độ và tỷ lệ thoát nang của phôi.

Phôi cá Ngựa vằn khi bị phơi nhiễm Cu^{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. Mặt khác, khi bị phơi nhiễm Cu^{2+} phôi cá Ngựa vằn cong vẹo cột sống, cong đuôi, cơ thể ngắn lại (Zhang, 2013).

Tóm lại, Cu^{2+} xâm nhập vào trong phôi gây ra những tác động nhất định lên sự phát

triển phôi. Ion đồng gây ảnh hưởng đến hệ cơ như làm giảm hoạt động quấy 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 thoát nang của phôi (làm phôi chậm hay không thoát nang có thể gây chết phôi).

Hiện nay, trên thế giới, 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, ở Việt Nam, chưa có công trình nào nghiên cứu về ảnh hưởng của ion đồng 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 đề cho những nghiên cứu tiếp theo về sự tác động của kim loại nặng trên thủy sinh vật trong giai đoạn môi trường thủy sinh ngày càng ô nhiễm.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy phôi cá Ngựa vằn khi bị phơi nhiễm ion đồng ở các nồng độ khảo sát làm thay đổi các chức năng sinh lí của phôi như nhịp tim của phôi tăng tuyến tính theo thứ tự tăng dần các nồng độ khảo sát tại giai đoạn hầu hống và giai đoạn thoát nang; nhịp quấy mình của phôi tại giai đoạn hầu hống giảm tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát; tỉ lệ thoát nang của phôi giảm tuyến tính theo thứ tự các nồng độ khảo sát, thấp nhất tại nồng độ 2000 $\mu\text{g/L}$ (đạt $13,33 \pm 3,85\%$).

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Huy Bá, *Độc học môi trường*. NXB Đại học Quốc gia TPHCM, pp.231-290, 2006.
- [2] B. Jezierska, K. Lugowska, and M. Witeska, "The effect of temperature and heavy metals on heart rate changes in common carp *Cyprinus carpio* L. and grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Val.) during embryonic development," *Archives of Polish Fisheries*, pp. 153-165, 2002.
- [3] B.K. Charles, W.W.B., R.K Seth., U. Bonnie, and F.S. Thomas, "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish," *Developmental dynamics*, 203, pp. 253-310, 1995.
- [4] R. Handy, F. Eddy, and H. Baines, "Sodium-dependent copper uptake across epithelia: a review of rationale with experimental evidence from gill and intestine," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1566, pp.104-115, 2002.
- [5] A. Johnson, E. Carew, and K. Sloman, "The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos," *Aquatic Toxicology*, 84, pp.431-438, 2007.
- [6] J. Lamb, "Regulation of the abundance of sodium pumps in isolated animal cells," *International Journal of Biochemistry*, 22, pp.1365-1370, 1990.
- [7] C. Lawrence, "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review," *Aquaculture*, 269: pp.1-20, 2007.

- [8] J. Li, R.A. Lock, P.H.Klaren, H.G. Swarts, F.M. Stekhoven, S.E.W. Bonga, and G. Flik, "Kinetics of Cu²⁺ inhibition of Na⁺ K⁺-ATPase," *Toxicology*, pp. 31-38, 1996.
- [9] J. Li, E.S. Quabius, S.E. Wendelaar Bonga, G. Flik, and RAC Lock, "Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*)," *Aquat Toxicol*, 43:1-11, 1998;
- [10] X. Shu, K. Cheng, N. Patel, F. Chen, E. Joseph, H.-J. Tsai, and J.-N. Chen, "Na, K-ATPase is essential for embryonic heart development in the zebrafish," *Development*, 130, pp.6165-6173, 2003.
- [11] J.C. Skou, and M. Esmann, "The Na, K-ATPase," *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 24, pp.249-261, 1992.
- [12] J.J. Stegeman, J.V. Gondstone, and M.E. Hahn, "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, 2010.
- [13] M. Westerfield, *The zebrafish book*, 5th ed, A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press, 2007.
- [14] C.M. Wood, "Toxic responses of the gill," *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. London, pp. 1-89, 2001.
- [15] Zhang, W., Miao, Y., Lin, K., Chen, L., Dong, Q., Huang, C., "Toxic effects of copper ion in zebrafish in the joint presence of CdTe QDs", *Environmental Pollution*, 176, pp.158-164, 2013.