



Original Article

The Toxicity of Pesticides on the Growth of Fish Medaka *Oryzias latipes*

Tran Thi Thu Huong^{1,*}, Nguyen Xuan Tong², Le Ta Dang Khoi³

¹Hanoi University of Mining and Geology, 18 Vien Street, Duc Thang, Bac Tu Liem, Hanoi, Vietnam

²Industrial University of Ho Chi Minh City, 12 Nguyen Van Bao, Go Vap, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Nha Trang University, Khanh Hoa, Vietnam

Received 14 April 2021

Revised 30 April 2021; Accepted 12 May 2021

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the acute toxicity of pesticides including DDT, endosulfan, lindane and atrazine to Medaka *Oryzias latipes* fish embryos by identify the LC₅₀ value and ratio of mortality after 24, 48, 72, and 96 hours of exposure. The fish *O. latipes* was obtained from the Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Vietnam, raised, and allowed sexual fertilization to conduct embryo collection. The one-day old fish embryos is harvested and exposed to different concentrations of DDT, endosulfan, lindane and atrazine respectively: 1,300; 1,500; 1,700; 1,900; 2,100 and 2,300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ DDT; 0.01; 0.1; 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ endosulfan; 0; 80; 110; 130; 150; 170; 210; 250, and 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ lindane and 150; 250; 350, and 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ atrazine. The results showed that endosulfan had the highest toxicity in the four surveying groups, starting at concentration of $<1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($0.6 \mu\text{g.L}^{-1}$). The study also noted that four kinds of pesticides caused serious effects on fish embryo growth and survival. Their toxicity gradually decreased from endosulfan to lindane, atrazine and eventually DDT with LC₅₀ values after 96 hours of exposure were 1123.8; 0.6; 116.2 and 165.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. The differences between the LC₅₀ values depended on several factors, such as the toxicant concentration, the exposure time,... The mortality rates of Medaka embryo *O. latipes* linearly increased with the toxicant concentrations and the exposure duration. These pesticides inhibited growth leading to the fish embryo death.

Keywords: Toxicity, Medaka fish, mortality ratio, plant protection chemicals, exposure.

* Corresponding author.

E-mail address: huonghmg@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4768>

Đánh giá độc tính của hóa chất bảo vệ thực vật đến sinh trưởng của cá Medaka *O. latipes*

Trần Thị Thu Hương^{1,*}, Nguyễn Xuân Tòng², Lê Tạ Đăng Khôi³

¹Trường Đại học Mỏ Địa chất, 18 phố Viên, Đức Thắng, Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh,
12 Nguyễn Văn Bảo, Gò Vấp, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam

Nhận ngày 14 tháng 4 năm 2021

Chỉnh sửa ngày 30 tháng 4 năm 2021; Chấp nhận đăng ngày 12 tháng 5 năm 2021

Tóm tắt: Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá độc tính của bốn nhóm hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) gồm DDT, endosulfan, lindane và atrazine đến phôi cá Medaka *O. latipes* bằng cách xác định tỷ lệ phôi sống/chết và giá trị LC₅₀ sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm. Cá Medaka *O. latipes* thu nhận từ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam, được nuôi trong thành và có khả năng sinh sản, cho cá đực và cái thụ tinh để tiến hành thu phôi. Phôi cá 24 h tuổi được phơi nhiễm với các nồng độ DDT, endosulfan, lindane và atrazine tương ứng là 1.300; 1.500; 1.700; 1.900; 2.100 và 2.300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ DDT; 0,01; 0,1; 1 và 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ endosulfan; 0; 80; 110; 130; 150; 170; 210; 250 và 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ lindane và 150; 250; 350 và 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ atrazine. Kết quả chỉ ra rằng endosulfan là hóa chất có độc tính cao nhất trong bốn nhóm khảo sát, gây độc chỉ với nồng độ $< 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Nghiên cứu ghi nhận bốn hóa chất này gây ra những ảnh hưởng nghiêm trọng đối với sự sinh trưởng và sống sót của phôi cá. Độc tính của chúng giảm dần từ endosulfan đến lindane, atrazine và cuối cùng là DDT với giá trị LC₅₀ lần lượt là 0,6; 116,2; 165,2 và 1123,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sau 96 h phơi nhiễm. Sự khác nhau giữa các giá trị LC₅₀ là do sự thay đổi của các yếu tố môi trường như: nồng độ chất độc, thời gian phơi nhiễm,... Tỷ lệ tử vong của phôi cá Medaka *O. latipes* tăng tuyến tính với nồng độ chất độc cũng như thời gian phơi nhiễm. Những hóa chất BVTV này đã ức chế sinh trưởng và làm chết phôi cá.

Từ khóa: Độc tính, cá medaka, tỷ lệ tử vong, hóa chất BVTV, phơi nhiễm.

1. Mở đầu

Hóa chất BVTV là những chất cần thiết cho sự phát triển và bảo quản cây trồng thông qua việc kiểm soát dịch hại trong nông nghiệp thương mại hiện đại [1]. Trong đó, nhóm clo hữu cơ (OCPs) và atrazine thường được sử dụng để kiểm soát sâu bọ, nấm và các loài côn trùng khác nhau nhằm tăng năng suất sản xuất và bảo vệ sức

khỏe cộng đồng, phòng chống muỗi gây bệnh sốt rét [2]. Các chất ô nhiễm hữu cơ gốc OCPs và atrazine có thể tồn lưu trong hệ sinh thái thủy sinh do xuất phát từ nhiều nguồn khác nhau như nước thải công nghiệp, nông nghiệp và đô thị, lắng đọng khí quyển, hoạt động ven biển, vận chuyển hàng hải và sự cố tràn dầu [3]. Trên toàn cầu, OCPs và atrazine bị nghiêm cấm hoặc hạn chế sử dụng từ một vài thập kỷ trước do khả năng

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: huonghumg@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4768>

gây độc của chúng. Tuy bị cấm nhưng OCPs và atrazine vẫn được phát hiện ở nhiều môi trường khác nhau, như trong các đại dương, các vùng biển, trong nước và trầm tích, trong không khí. Quá trình phơi nhiễm với các hóa chất này trong môi trường có ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ sinh thái và sự phát triển của các sinh vật thủy sinh.

Bên cạnh DDT, endosulfan đã được phân loại là chất ô nhiễm hữu cơ khó phân hủy (POPs) theo Công ước Stockholm năm 2011 [4] do sự di chuyển và tích lũy sinh học mạnh mẽ của chúng trong môi trường [5] thì Lindane, Atrazine cũng là những nhóm hóa chất bảo vệ thực vật có độc tính cao, được sử dụng để kiểm soát cỏ dại và tồn tại rộng rãi trong nước, gây hại cho động vật thủy sinh [6-8]. Độc tính cấp tính của các OCPs và atrazine đối với một số loài khác nhau đã được nhiều nghiên cứu công bố, trong đó giá trị LC_{50} thường được sử dụng để đánh giá độc tính cấp tính liên quan đến tỷ lệ tử vong và tỷ lệ sống sót của các loài thử nghiệm [9-11]. Kết quả nghiên cứu của Ton và cộng sự (2006) [9] về độc tính của DDT và atrazine đến sinh trưởng của cá ngựa vằn cho thấy hai hoạt chất này không nhưng gây dị dạng phôi mà còn tăng khả năng miễn cảm của các cá thể với nồng độ chất độc trong môi trường nước. Chỉ số LC_{50}/EC_{50} của atrazine và DDTs ở 96 h có giá trị lần lượt là 2,8 và 3,5 mM. Với nồng độ endosulfan thấp (cả endosulfan I và II) vẫn gây ra tỷ lệ tử vong cao đối với phôi cá ngựa vằn [10], làm suy yếu sự phát triển của nòng nọc [11] và gây rối loạn nội tiết, thay đổi cấu trúc mô tế bào [12]. Độc tính của lindane đối với hai loài cá *Corydoras paleatus* và *Jenynsia multidentata* đã được Pesce và cs ghi nhận [13]. Mặt khác, ở Việt Nam dù đã bị cấm từ vài thập kỷ trước nhưng một số OCPs đã được sử dụng trước đây trong một thời gian dài vẫn có thể tồn lưu trong môi trường với các nồng độ khác nhau. Một số nghiên cứu đã được thực hiện để đánh giá tác động khác nhau của chúng tới các hệ sinh thái thủy sinh như nghiên cứu của N. H. Minh và cộng sự [14] chỉ ra rằng nồng độ DDTs trong trầm tích thu nhận ở các kênh rạch tại Thành phố Hồ Chí Minh cao hơn nhiều so với những vị trí khác trong vùng nghiên cứu. P. M. Hoài và cộng

sự [15] đã phát hiện nồng độ của tổng DDTs trong trầm tích lấy từ một số sông ở Hà Nội cao hơn các địa điểm khác ở Việt Nam. Kết quả này chỉ ra rằng DDTs đã được sử dụng bất hợp pháp và sau đó được thải ra môi trường trong khu vực nghiên cứu.

Với những ảnh hưởng tiềm ẩn của hóa chất BVTV đến sự sinh trưởng của sinh vật thủy sinh, nghiên cứu này đã lựa chọn đánh giá độc tính của một số OCPs và atrazine đến phôi cá Medaka. Medaka là loài cá nhỏ, có nguồn gốc từ Đông Nam Á với những ưu điểm nổi bật như thời gian mang thai và vòng đời ngắn, sinh sản dễ dàng, phôi trong suốt nên có thể dễ dàng quan sát phát triển như chuyển gen, đột biến gen,... hơn nữa chi phí nuôi cá khá thấp, việc thực hiện thí nghiệm trên cá đơn giản hơn nhiều so với các loài động vật có vú khác [16, 17]. Bộ gen cá Medaka cũng đã được giải mã và có tới 57,7% gen chứa Ortholog ở người [18, 19]. Do đó, cá Medaka đã được sử dụng rộng rãi như sinh vật mô hình trong thí nghiệm đánh giá độc tính và các nghiên cứu sàng lọc cấu trúc mô, tế bào ở người [16-19]. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích đánh giá độc tính của bốn nhóm hóa chất bảo vệ thực vật gồm DDT, endosulfan, lindane và atrazine đến phôi cá Medaka Nhật Bản (*Oryzias latipes*) sau 96h phơi nhiễm thông qua việc tính toán giá trị LC_{50} và xác định ảnh hưởng của chúng đến sự phát triển của phôi cá.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất bảo vệ thực vật

Bốn nhóm hóa chất được lựa chọn gồm DDT, endosulfan, lindane và atrazine có nguồn gốc từ Sigma-Aldrich với độ tinh khiết cao được sản xuất vào 6/2020 ($\geq 97\%$). Các dung dịch thử nghiệm được pha từ dung dịch gốc và được lưu trữ trong bóng tối tại phòng thí nghiệm Viện Khoa học Công nghệ và Quản lý Môi trường – Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh. Dải pha loãng của các hóa chất được pha theo quy trình của Knöbel và cộng sự (2012) và

N. X. Tồng và cộng sự (2020) [21, 22]. Các dung dịch gốc chưa sử dụng được bảo quản trong chai thủy tinh ở nhiệt độ 4 °C và bọc bằng giấy nhôm để giảm thiểu khả năng phân hủy quang học.

2.2. Chuẩn bị phôi cá Medaka *O. latipes*

Cá Medaka Nhật Bản 03 tháng tuổi được nuôi cấy tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh theo chu kỳ 16 h sáng: 8 h tối, nhiệt độ 24 ± 2 °C và cho ăn hai lần mỗi ngày với tôm biển mới nở. Phôi Medaka trưởng thành và có khả năng sinh sản, cho cá đực và cái thụ tinh để tiến hành thu phôi mỗi ngày vào lúc 9 h sáng trong đĩa petri (60 mm x 15 mm) trước khi tiến hành thí nghiệm.

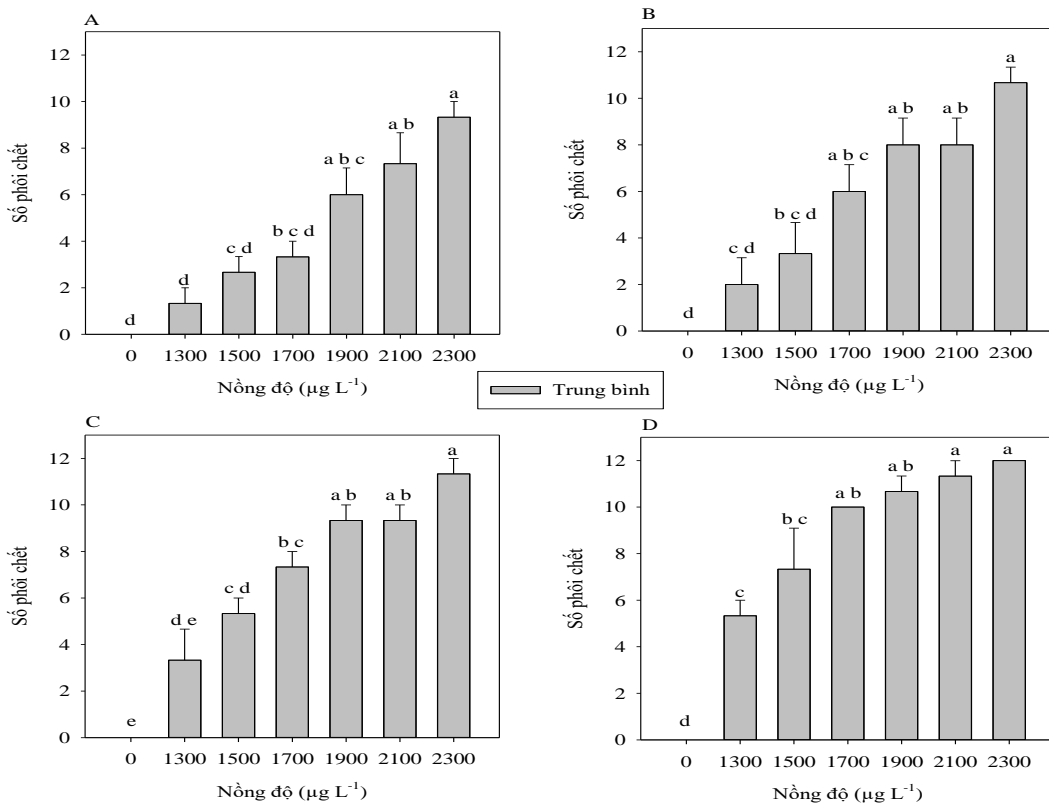
2.3. Thiết kế thí nghiệm

12 phôi cá Medaka *O. latipes* (24 h tuổi) được lựa chọn ngẫu nhiên và cho vào mỗi giếng

(loại khay nhựa 12 giếng - Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) chứa 9 mL hóa chất lần lượt như sau: 1.300; 1.500; 1.700; 1.900; 2.100 và 2.300 µg.L⁻¹ DDT; 0.01; 0.1; 1 và 10 µg.L⁻¹ endosulfan; 0; 80; 110; 130; 150; 170; 210; 250 và 300 µg.L⁻¹ lindane và 150; 250; 350 và 450 µg.L⁻¹ atrazine. Các nồng độ thử nghiệm và mẫu đối chứng (mẫu không bổ sung hóa chất BVTV) được lặp lại 3 lần. Độc tính cấp tính của hóa chất BVTV được tính bằng tỷ lệ phôi sống/chết nhờ soi kính hiển vi tại 24, 48, 72 h.

2.4. Xử lý số liệu thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Tất cả các số liệu được thống kê, tính toán và vẽ bằng phần mềm JMP Pro 13 với ý nghĩa thống kê p < 0.05. Ước tính giá trị LC₅₀ tại thời điểm 24, 48, 72 và 96 h được tính bằng phương pháp Probit (Finney, 1971) [23] và phần mềm SPSS 20.



Hình 1. Biến động tỷ lệ phôi cá Medaka tử vong sau 24 (A), 48 (B), 72 (C) và 96 h (D) phơi nhiễm với 0; 1.300; 1.500; 1.700; 1.900; 2.100 và 2.300 µg.L⁻¹ hóa chất BVTV DDT.

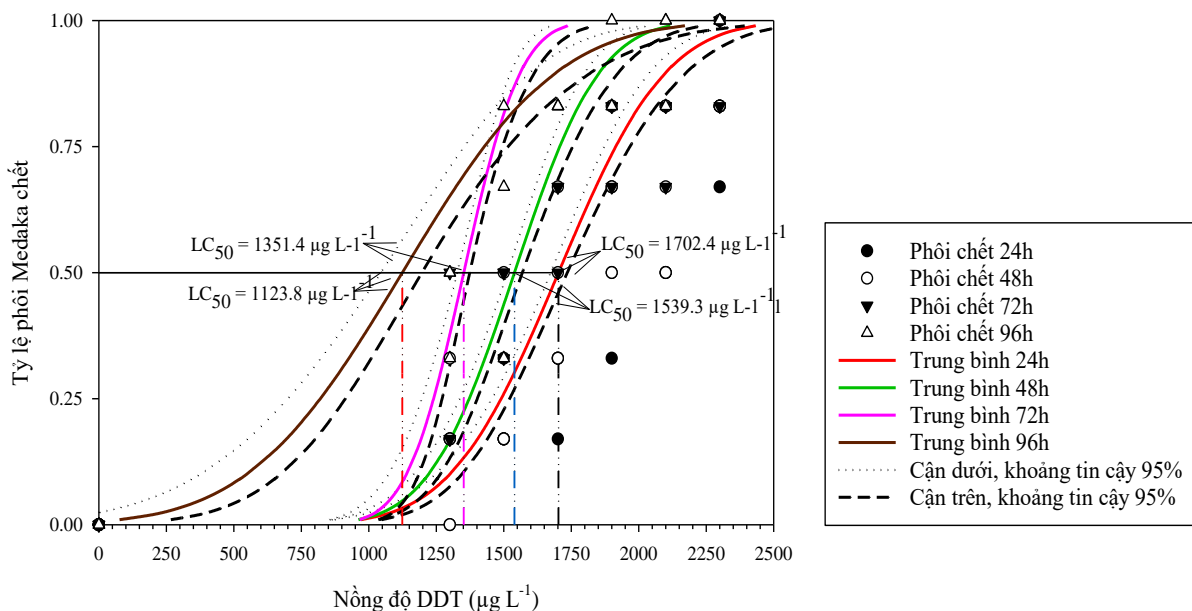
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của hóa chất DDT

Độc tính của DDT đến phôi cá Medaka sau 24, 48, 72 và 96 h được thể hiện ở Hình 1. Kết quả cho thấy tỷ lệ tử vong của phôi cá tăng tuyến tính với nồng độ DDT đã phơi nhiễm. Với các nồng độ phơi nhiễm 0; 1.300; 1.500; 1.700; 1.900; 2.100 và 2.300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ tỷ lệ tử vong của phôi cá sau 24h lần lượt là 0; 11; 22; 28; 50; 61 và 78%; sau 48 h là 0; 17; 28; 50; 67; 67 và 89%. Khi thời gian phơi nhiễm tăng lên 72h thì giá trị đã tăng từ 0; 28; 44; 61; 78; 78 đến 94%, và sau 96 h ghi nhận kết quả tăng lên đến 100% với các giá trị cụ thể là 0; 44; 61; 83; 89; 94 và 100% ($p < 0,05$). Hình 2 thể hiện kết quả xác định giá trị LC_{50} của thí nghiệm phơi nhiễm phôi cá Medaka với DDT sau 24, 48, 72 và 96h lần lượt là 1702,4; 1539,3; 1351,4 và 1123,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tử vong tăng dần và giá trị LC_{50} giảm dần khi tăng nồng độ độc chất, giá trị ghi nhận lần lượt là 100% và 1123,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sau 96 h phơi nhiễm. Ghi nhận này tương tự với công bố trước đây của nhóm tác giả

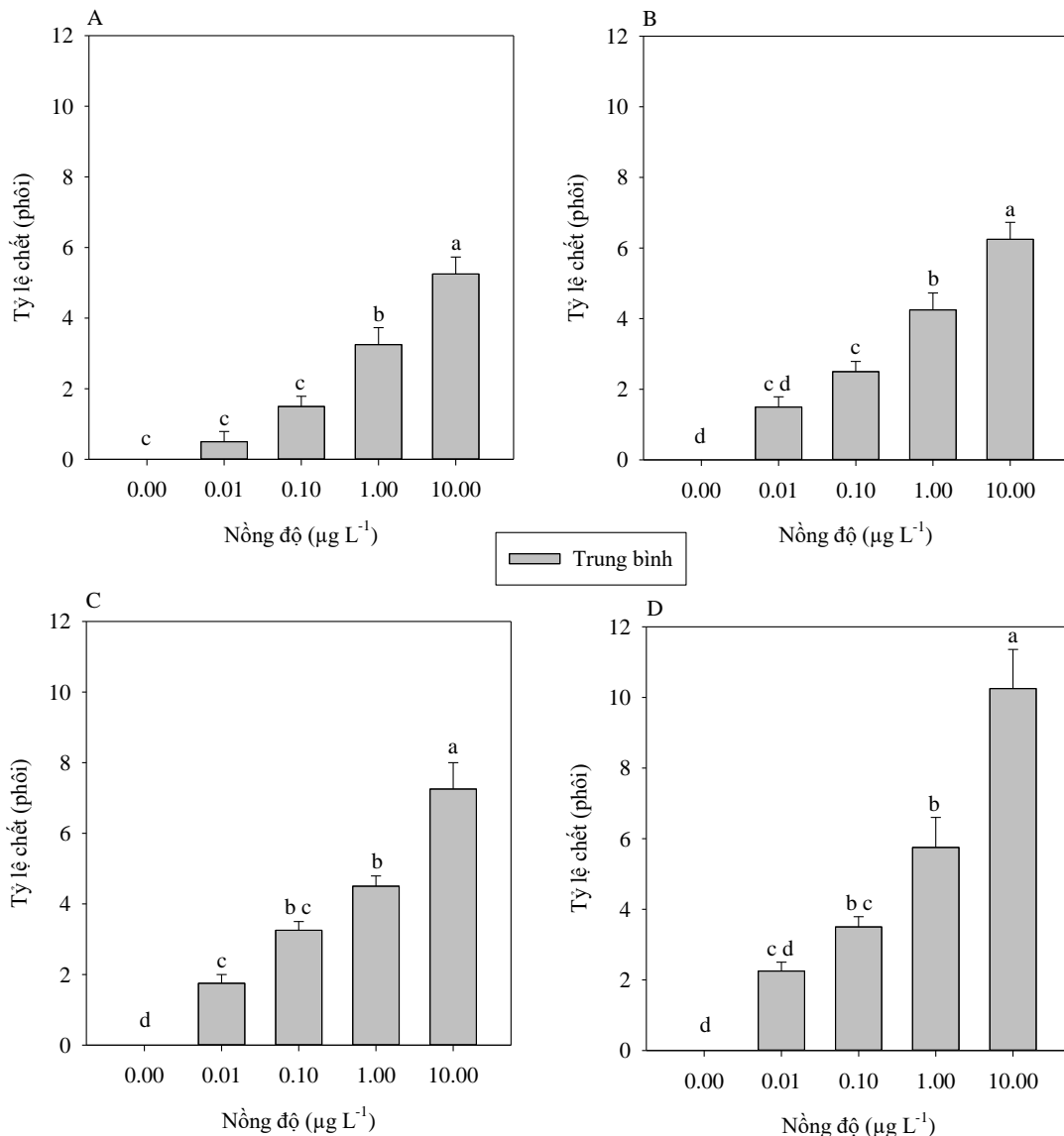
N. X. Tong và cộng sự (2020) [22] khi sử dụng phôi cá Medaka để đánh giá độc tính của các đồng phân DDTs. Hầu hết phôi cá Medaka đều không có khả năng sống sót với dải nồng độ o,p' -DDT từ 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,2; 0,24 đến 0,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm. Giá trị LC_{50} sau 24, 48, 72 và 96 h giảm dần lần lượt là 0,1013; 0,0772; 0,0486 và 0,0359 $\mu\text{g.L}^{-1}$ thấp hơn nhiều so với nghiên cứu hiện tại [22]. Một số nghiên cứu khác cũng ghi nhận giá trị LC_{50} khá thấp như LC_{50} của o,p' -DDT trên cá sóc (*Oryzias curvinotus*) sau 48h là 0,0406 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [24] hay DDT trên cá chép (*C. carpio*), cá da trơn và cá Medaka lần lượt là 57; 2.000 và 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [25] hoặc trên cá *Salmo gairdneri* sau 96 h phơi nhiễm là 8,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [26]. Ngoài việc gây tử vong và ảnh hưởng đến sự phát triển của sinh vật ở giai đoạn sớm, hóa chất DDT còn có thể tích lũy trong các mô hoặc bào quan làm thay đổi tác dụng của estrogen [27], gây gây quái thai ở cá ngựa vằn sau 48 và 96 h phơi nhiễm [9], gây co giật, tăng dị tật, giảm tỷ lệ sống sót trong nhóm phơi nhiễm liều cao ở phôi cá ngựa vằn [28] và tác động đến nhịp tim phôi cá [24].



Hình 2. Đồ thị tương quan giữa liều phản ứng với nồng độ độc chất và tỷ lệ tử vong sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm với DDT.

Ảnh hưởng của hóa chất Endosulfan tương tự như hóa chất DDT. Hình 3 thể hiện kết quả đánh giá độc tính của endosulfan đến phôi cá Medaka sau 24, 48, 72 và 96 h. Kết quả cho thấy tỷ lệ tử vong tăng khi thời gian phơi nhiễm tăng. Tuy nhiên, tỷ lệ này ở các khoảng thời gian phơi nhiễm khá thấp. Sau 24h giá trị cao nhất ghi nhận là 44% và tăng dần lên 52% (ở 48 h), 60% (ở 72 h) và tại 96 h chỉ đạt 85%. Tỷ lệ tử vong của phôi cá Medaka sau khi phơi nhiễm với các nồng độ

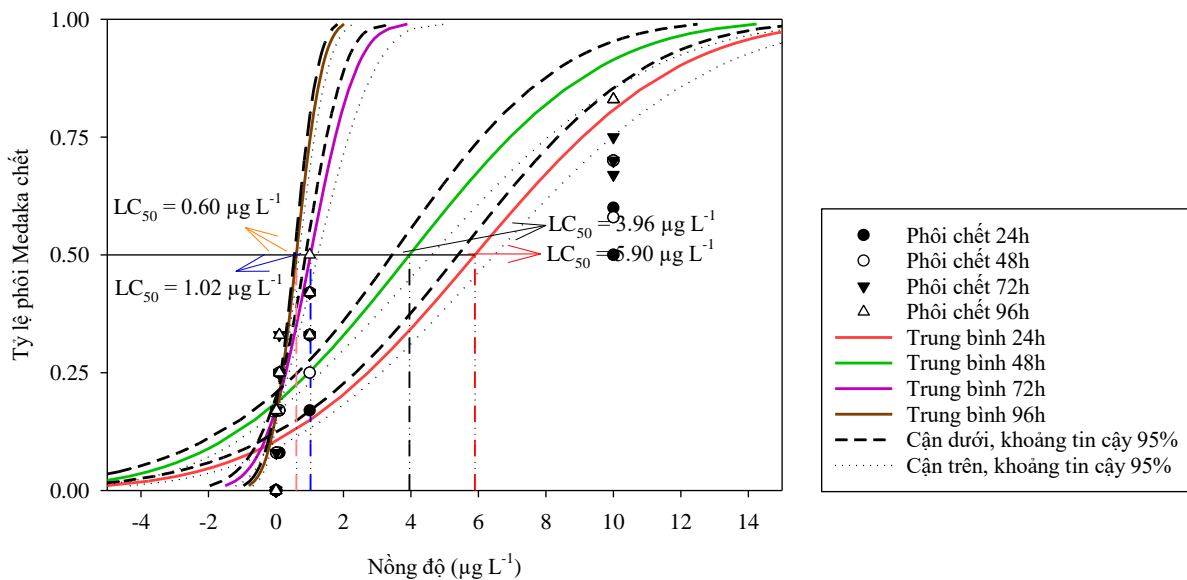
0; 0,01; 0,1; 1 và 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sau 24h đã ghi nhận giá trị lần lượt là 0; 4; 13; 27 và 44%. Khi thời gian kéo dài đến 48h thì tỷ lệ tử vong bắt đầu tăng lên là 0; 13; 21; 35 và 52% và sau 72 h là 0; 15; 27; 38 và 60%. Khi tăng lên đến 96 h đã ghi nhận tỷ lệ cao nhất với các giá trị lần lượt là 0; 19; 29; 48 và 85% ($p < 0,05$). Giá trị LC_{50} tính toán được tại 24, 48, 72 và 96 h đã giảm dần, lần lượt là 5,9; 4; 1 và 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p < 0,05$) (Hình 4).



Hình 3. Biến động tỷ lệ phôi cá Medaka tử vong sau 24 (A), 48 (B), 72 (C) và 96 h (D) phơi nhiễm với 0; 0,01; 0,1; 1 và 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ hóa chất BVTV endosulfan.

Trong nghiên cứu này, độc tính của endosulfan đối với phôi Medaka thấp hơn nhiều so với ghi nhận của Moon và cộng sự trên phôi cá ngựa vằn *D. rerio* với giá trị $LC_{50} > 1.200 \mu\text{g.L}^{-1}$ [29], và nghiên cứu Chow và cộng sự là $240 \mu\text{g.L}^{-1}$ [30]. Endosulfan gây ra những ảnh hưởng nghiêm trọng đối với phôi cá, gây ảnh hưởng đến sắc tố, nhịp tim, gây phù nề, biến dạng cột sống và làm tử vong sau khi phơi nhiễm [31, 32]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cũng ghi nhận ảnh hưởng cấp tính của endosulfan đến sinh trưởng và phát triển của một số nhóm sinh vật khác như phôi cóc Nam Mỹ (*Rhinella arenarum*)

[33], ấu trùng loài lưỡng cư (*Rana boylii*) [34], ấu trùng cá *Cichlasoma dimerus* [35]. Các nghiên cứu này đều cho thấy tác động đáng kể đến quần thể sinh vật khi tiếp xúc với nồng độ endosulfan tương tự trong tự nhiên, ảnh hưởng mạnh mẽ đến các thông số huyết học, sinh hóa và mô bệnh học của sinh vật khi nhiễm độc cấp tính [36]. Giá trị LC_{50} trong nghiên cứu hiện tại và các nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ tử vong của các loài có liên quan đến sự gia tăng nồng độ endosulfan và thời gian phơi nhiễm với độc chất của sinh vật.

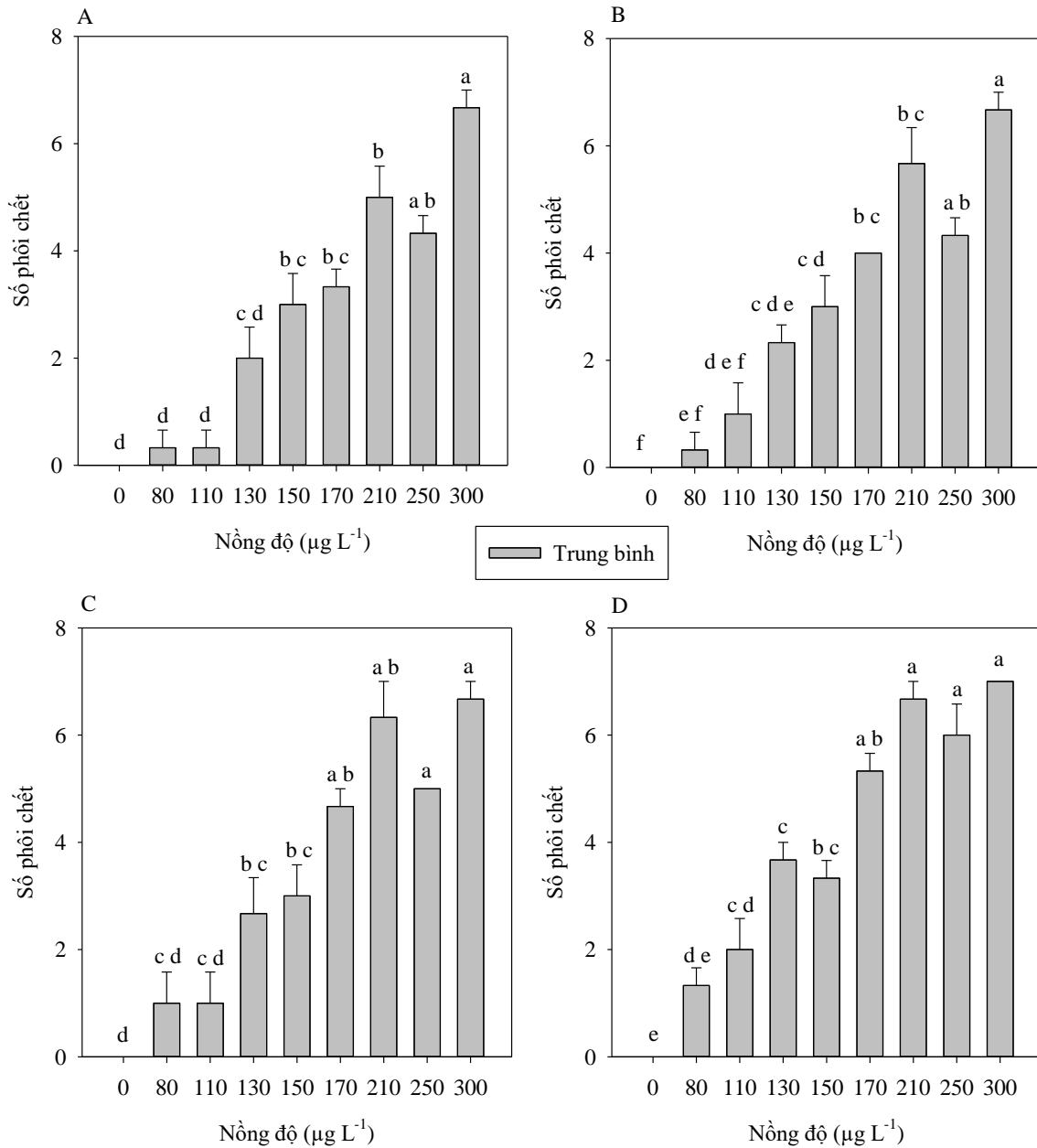


Hình 4. Đồ thị tương quan giữa liều phản ứng với nồng độ độc chất và tỷ lệ tử vong sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm với Endosulfan.

3.3. Lindane

Hình 5 thể hiện kết quả đánh giá độc tính của lindane lên phôi Medaka cho thấy, sau khi phơi nhiễm với các nồng độ từ 0; 80; 110; 130; 150; 170; 210; 250 và $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ thì tỷ lệ tử vong cao nhất tại 24, 48, 72 và 96 h cao hơn so với DDT và endosulfan. Tại 24 h tỷ lệ tử vong cao nhất ghi nhận là 95% và duy trì tỷ lệ này ở 48 và 72 h tiếp theo. Tỷ lệ tử vong đã lên tới 100% sau 96 h phơi nhiễm. Tỷ lệ tử vong ở các nồng độ hóa chất phơi nhiễm sau 24, 48, 72 và 96 h lần lượt là: 0,

5, 5, 29, 43, 48, 71, 62, 95%; 0, 5, 14, 33, 43, 57, 81, 62, 95%; 0, 14, 14, 38, 43, 67, 90, 71, 95% và 0, 19, 29, 52, 48, 76, 95, 86, 100%. Số lượng phôi chết tăng dần theo nồng độ phơi nhiễm, tuy nhiên tại nồng độ $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ ở tất cả các khoảng thời gian phơi nhiễm tỷ lệ tử vong lại giảm. Kết quả này cho thấy các điều kiện thử nghiệm như nhiệt độ phòng thí nghiệm, hóa chất, tình trạng phôi, môi trường nuôi cấy, khả năng phản ứng của cơ thể sinh vật với độc chất,... đã tác động đến khả năng sống sót của phôi cá [22, 24].



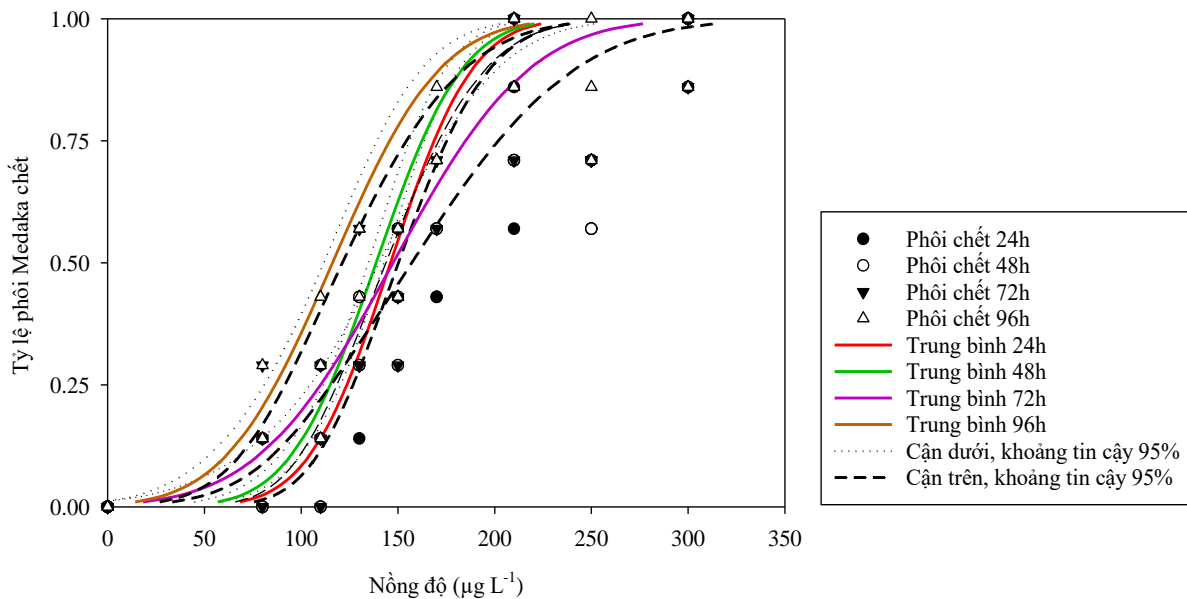
Hình 5. Biến động tỷ lệ phôi cá Medaka tử vong sau 24 (A), 48 (B), 72 (C) và 96 h (D) phơi nhiễm với 0; 80; 110; 130; 150; 170; 210; 250 và 300 µg.L⁻¹ hóa chất BVTV lindane.

Kết quả tính toán LC₅₀ sau 24, 48, 72 và 96 h ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) giữa các nồng độ phơi nhiễm với phôi medaka. Các giá trị LC₅₀ tính toán thu được lần lượt là 146,1; 138,7; 147,5 và 116,2 µg.L⁻¹ (Hình 6) phù hợp với kết quả xác định tỷ lệ tử vong của

phôi cá. Ghi nhận trong nghiên cứu này tương tự với một số công trình đã công bố trước đây [25, 37, 38]. Sau 96 h phơi nhiễm LC₅₀ ghi nhận giá trị là 116,2 µg.L⁻¹ tương tự với kết quả xác định trên cá Medaka của Qu và cộng sự (2011) là 120 µg.L⁻¹ [25] hay trên cá *Solea senegalensis* là

160 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [37]. Lindane cũng được báo cáo gây ra những biến dạng phân đầu đối với sự phát triển của phôi cá ngựa vằn [38]. Các đồng phân lập thể của HCH phổ biến nhất được tìm thấy trong môi trường gồm alpha, beta và gamma-HCH. Trong không khí, các đồng phân của HCH có thể tồn tại ở dạng hơi hoặc gắn với các hạt nhỏ như đất và

bụi và phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện môi trường [39]. Trong đó, γ -HCH hay lindane rất độc đối với sinh vật dưới nước và khá độc hại với các loài chim và động vật có vú sau phơi nhiễm cấp tính. Vì thế, việc sử dụng lindane trong môi trường cần phải được xem xét một cách cẩn trọng tại các cơ sở sản xuất.

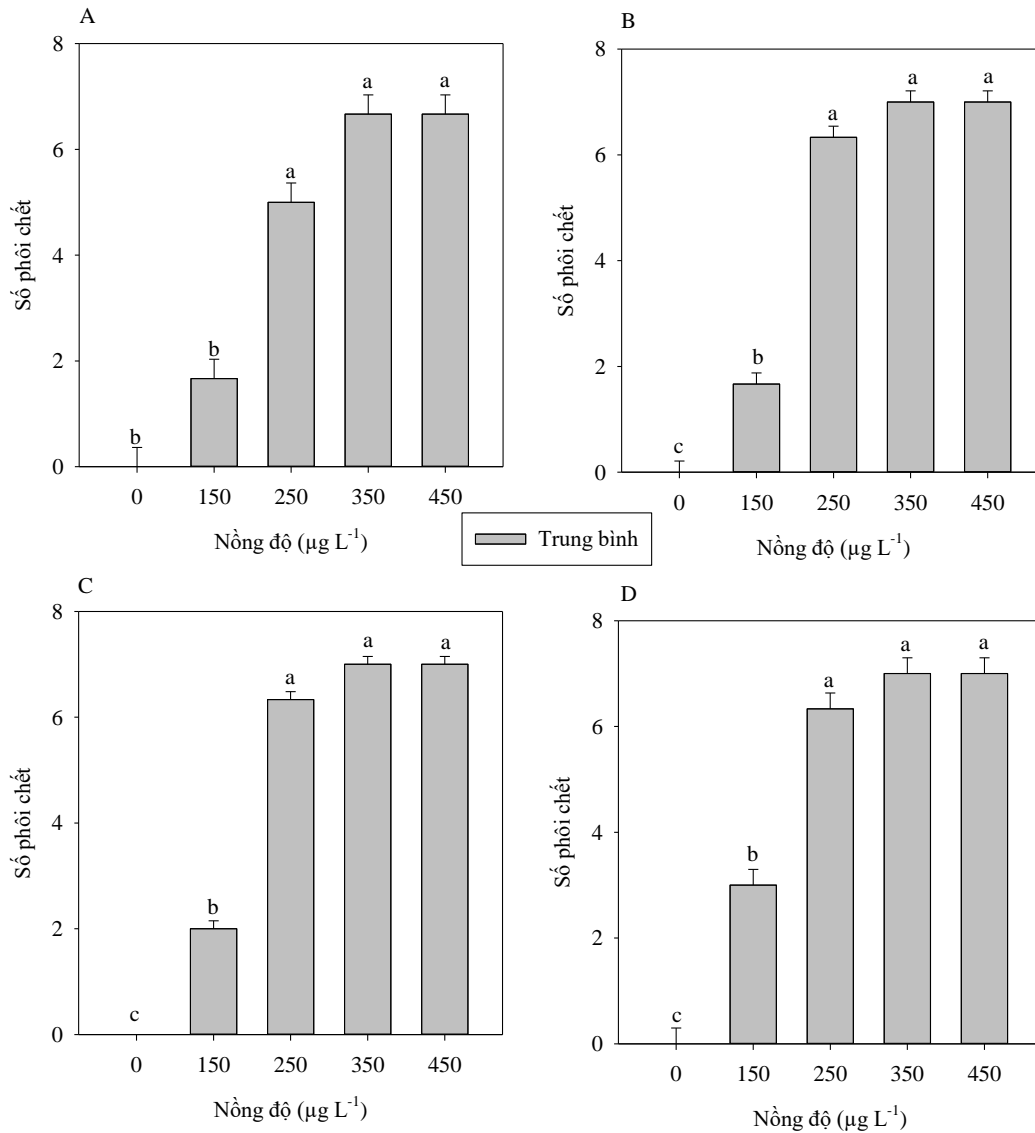


Hình 6. Đồ thị tương quan giữa liều phản ứng với nồng độ độc chất và tỷ lệ tử vong sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm với Lindane.

3.4. Atrazine

Atrazine thuộc nhóm chloro-triazine là một loại thuốc diệt cỏ khó tan trong tự nhiên. Atrazine dễ phản ứng, dễ cháy, dễ bị rò rỉ và rửa trôi ra bên ngoài môi trường, đặc biệt là trong những trận mưa lớn [40]. Thời gian bán hủy của atrazine trong đất dao động từ 60 đến 150 ngày. Tuy nhiên, khi điều kiện tồn tại thay đổi từ hiếu khí sang kỵ khí, tốc độ thoái hóa chậm lại đáng kể (thời gian bán hủy khoảng 660 ngày trong đất sét trầm tích ủ yếm khí). Thời gian bán hủy trong hồ chứa có thể là 1 đến 2 năm. Sự chậm lại về tốc độ phân hủy này gây ra những hậu quả rất lớn, dẫn đến sự tồn lưu của atrazine trong môi trường [40]. Một số dữ liệu thực nghiệm và thực địa hiện trường đã chỉ ra rằng atrazine và sự thoái hóa của nó tồn tại trong một số loại đất và trong

các sông hồ gây nguy hiểm cho hệ sinh thái [40]. Trong nghiên cứu này cho thấy khi phơi nhiễm với các nồng độ atrazine từ 0; 150; 250; 350 đến 450 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sau 24, 48, 72 và 96 h cho thấy tỷ lệ tử vong khá cao, phần trăm phôi chết tăng dần theo thời gian phơi nhiễm với giá trị lần lượt là 94, 98, 99 và 99% (Hình 7). Giá trị này tương tự với ghi nhận ở hóa chất DDT và cao hơn endosulfan cũng như lindane. Sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm tỷ lệ tử vong ghi nhận ở các dải nồng độ tương ứng là 0, 27, 74, 92, 94%; 0, 28, 87, 94, 98%; 0, 30, 89, 95, 99% và 0, 42, 89, 96, 99% ($p < 0,05$) (Hình 7). Tương tự, kết quả tính toán giá trị LC_{50} của atrazine đến phôi cá Medaka cho thấy sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm cũng giảm dần và có giá trị lần lượt là 190,4; 169,8; 166,5 và 165,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Hình 8).



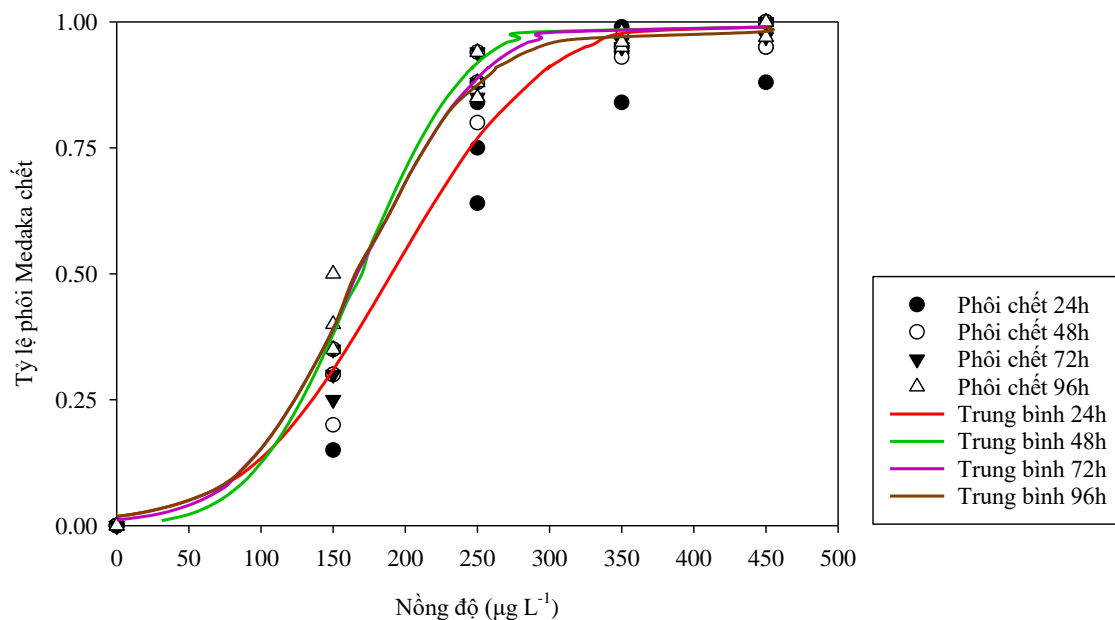
Hình 7. Biến động tỷ lệ phôi cá Medaka tử vong sau 24 (A), 48 (B), 72 (C) và 96 h (D) phơi nhiễm với 0; 150; 250; 350 và 450 µg.L⁻¹ hóa chất BTVT atrazine.

Kết quả đánh giá độc tính của atrazine đến sinh trưởng của một số sinh vật thủy sinh đã ghi nhận giá trị LC₅₀ cao hơn nghiên cứu này [25, 41, 42]. Sau 48 h phơi nhiễm với atrazine, ba loài cá là cá chép *C. carpio*, cá da trơn và cá Medaka đã tính toán được LC₅₀ lần lượt là 41.000; 8.000 và 10.000 µg.L⁻¹ [25] hay sinh vật phù du tầng đáy *H. azteca* là LC₅₀ > 10.000 µg.L⁻¹ [41] hoặc vi giáp xác *Daphnia magna* thì LC₅₀ xác định được có giá trị lên tới 50,41 mg.L⁻¹ [42]. Một số

tác giả cũng ghi nhận atrazine còn tác động đến khả năng sinh sản của cá [43, 44]. Nghiên cứu tương tự cũng chỉ ra rằng phôi cá medaka Nhật Bản (*Oryzias latipes*) phơi nhiễm với atrazine sẽ bị tắc nghẽn tuần hoàn, co giật dẫn đến tử vong [45]. Bên cạnh đó, atrazine làm đông máu trứng, gây chậm phát triển, phù nề, vẹo cột sống đối với phôi cá ngựa vằn [46]. Ngược lại, Solomon và cộng sự lại báo cáo rằng atrazine không có tác động đáng kể nào đối với động vật thủy sinh

[47]. Kết quả thử nghiệm của nhóm hóa chất OCPs và atrazine cho thấy, giá trị LC_{50} giảm dần chứng tỏ sức đề kháng của cá giảm khi tăng thời gian phơi nhiễm với độc chất [22]. Sự thay đổi này cho thấy khi kéo dài thời gian phơi nhiễm thì hóa chất BVTV sẽ xâm nhập nhiều hơn vào cơ thể và gây ra những tác động bất lợi đến bào quan, làm dị dạng phôi, suy giảm tuần hoàn thậm chí làm suy tim khiến cá mất sức sống dẫn đến tử vong [48]. Với cùng một loại thuốc BVTV nhưng tác động đến các loài khác nhau sẽ ghi nhận giá trị LC_{50} là khác nhau. Vì vậy đường cong độc tính thường được sử dụng để đánh giá cơ chế tác động của độc chất (Hình 2, 4, 6 và 8). Dang và cộng sự (2016) chỉ ra rằng hóa chất BVTV có khả năng tích lũy liên tục hay gián đoạn trong mô hoặc bào quan hay không được biểu thị thông qua hình dạng của đường cong độc tính [49]. Hơn nữa, khi xâm nhập vào bên trong cơ thể sinh vật nhóm hóa chất BVTV này có thể chuyển hóa thành các dạng đồng phân như DDE, o,p'- DDT, p,p'-DDT,... hoặc γ -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sunphat và γ -HCH dễ tích tụ hơn trong mô và các bào quan. Dù ở dạng nào thì các đồng phân này cũng rất độc và

dễ xâm nhập vào gan tạo thành các khối u, khi nồng độ hấp thụ đạt ngưỡng sẽ làm tổn thương não và hệ thần kinh - yếu tố quan trọng nhất làm phôi cá mất khả năng sinh sống [48]. Trong đó, γ -HCH hay lindane là đồng phân HCH rất độc gây tổn thương nghiêm trọng đến hệ thống trung tâm thần kinh và nội tiết ở người và động vật [39]. Độc tính của hóa chất BVTV còn phụ thuộc vào trọng lượng và kích thước của cá thể nghiên cứu. Theo Peter (1986) [50] thì những sinh vật có kích thước cơ thể nhỏ hơn sẽ bị tác động nhiều hơn khi cùng phơi nhiễm với một dải nồng độ độc chất. Bên cạnh đó, những cá thể nhỏ thường có tốc độ hô hấp và quá trình tuần hoàn trao đổi chất cao làm cho lượng hóa chất bảo vệ thực vật đi vào cơ thể nhanh hơn những cá thể lớn [50]. Như vậy có thể thấy, các dạng tồn tại và nồng độ hóa chất bảo vệ thực vật phơi nhiễm có sự liên quan tuyến tính với khả năng sinh trưởng của sinh vật thử nghiệm. Do đó, khi sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật nói chung và bốn nhóm hóa chất DDT, endosulfan, lindane và atrazine nói riêng cần được xem xét một cách thận trọng nhằm hạn chế ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển của các sinh vật trong hệ sinh thái thủy sinh.



Hình 8. Đồ thị tương quan giữa liều phản ứng với nồng độ độc chất và tỷ lệ tử vong sau 24, 48, 72 và 96 h phơi nhiễm với Atrazine.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã sử dụng phôi cá Medaka *O. latipes* để đánh giá ảnh hưởng độc cấp tính của bốn hóa chất BVTV là DDT, endosulfan, lindane và atrazine bằng việc xác định tỷ lệ tử vong và giá trị LC_{50} sau 24, 48, 72 và 96h phơi nhiễm. Kết quả chỉ ra rằng endosulfan là hóa chất có độc tính cao nhất trong bốn nhóm khảo sát, gây độc chỉ với nồng độ $< 1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$). Nghiên cứu ghi nhận các hóa chất BVTV gây ra những ảnh hưởng nghiêm trọng đối với sự sinh trưởng và sống sót của phôi cá, độc tính của các hoạt chất giảm dần từ endosulfan đến lindane, atrazine và cuối cùng là DDT với giá trị LC_{50} lần lượt là 0,6; 116,2; 165,2 và 1123,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sau 96 h phơi nhiễm. Các hóa chất BVTV này đã ức chế sinh trưởng và gây chết phôi cá. Vì thế, cần xem xét một cách cẩn thận khi sử dụng nhóm hóa chất BVTV này trong các vùng nước tự nhiên nói riêng và hệ sinh thái thủy sinh nói chung.

Tài liệu tham khảo

- [1] A. Mishra, J. Kumar, J. S. Melo, An Optical Microplate Biosensor for the Detection of Methyl Parathion Pesticide Using a Biohybrid of *Sphingomonas* sp. Cells-silica Nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 87, 2017, pp. 332-338.
- [2] F. P. Carvalho, Pesticides, Environment, and Food Safety, *Food and Energy Security*, Vol. 6, 2017, pp. 48-60.
- [3] P. Montuori, S. Aurino, F. Garzonio, M. Triassi, Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Tiber River and Estuary: Occurrence, Distribution and Ecological Risk, *Science of the Total Environment*, Vol. 571, 2016, pp. 1001-1016.
- [4] L. Becker, M. Scheringer, U. Schenker, K. Hungerbuhler, Assessment of the Environmental Persistence and Long-range Transport of Endosulfan, *Environ Pollut*, Vol. 159, 2011, pp. 1737-1743.
- [5] F. Kafilzadeh, M. Ebrahimnezhad, Y. Tahery, Isolation and Identification of Endosulfan-Degrading Bacteria and Evaluation of Their Bioremediation in Kor River, Iran, *Osong Public Health Res Perspect*, Vol. 6, 2015, pp. 39-46.
- [6] C. Zhang, H. X. Li, L. Qin, J. Ge, Z. Qi, M. Talukder, Y. H. Li, J. L. Li, Nuclear Receptor AHR-Mediated Xenobiotic Detoxification Pathway Involves in Atrazine-induced Nephrotoxicity in Quail (*Coturnix C. coturnix*), *Environmental Pollution*, Vol. 253, 2019, pp. 889-898.
- [7] C. Y. Zhu, W. L. Yang, H. J. He, C. P. Yang, J. P. Yu, X. Wu, G. M. Zeng, S. Tarre, M. Green, Preparation, Performance and Mechanisms of Magnetic *Saccharomyces cerevisiae* Bionanocomposites for Atrazine Removal, *Chemosphere*, Vol. 200, 2018, pp. 380-387.
- [8] R. M. Maier, T. J. Gentry, *Microorganisms and Organic Pollutants*, Environmental Microbiology, Elsevier Inc Publishing House, United State, Vol. 3, 2015, pp. 377-413.
- [9] C. Ton, Y. Lin, C. Willett, Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Testing, *Birth Defects Res A: Clin Mol Teratol*, Vol. 76, 2006, pp. 553-567.
- [10] K. A. Stanley, L. R. Curtis, S. L. Massey Simonich, R. L. Tanguay, Endosulfan I and Endosulfan Sulfate Disrupts Zebrafish Embryonic Development, *Aquatic Toxicology*, Vol. 95, 2009, pp. 355-361.
- [11] C. Stechert, M. Kolb, M. O. Rödel, M. Ahadir, Effects of Insecticide Formulations Used in Cotton Cultivation in West Africa on the Development of Flat-backed Toad Tadpoles (*Amietophrynus maculatus*), *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 22, 2014, pp. 2574-2583.
- [12] J. Han, H. Chang, L. Loss, K. Zhang, F. Baehner, J. Gray, P. Spellman, B. Parvin, Comparison of Sparse Coding and Kernel Methods for Histopathological Classification of Glioblastoma Multiforme, *Proc IEEE Int Symp Biomed Imaging*, 2011, pp. 711-714.
- [13] S. F. Pesce, J. Cazenave, M. V. Monferran, S. Frede, D. A. Wunderlin, Integrated Survey on Toxic Effects of Lindane on Neotropical Fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*, *Environ Pollut*, Vol. 156, 2008, pp. 775-783.
- [14] N. H. Minh, T. B. Minh, H. Iwata, N. Kajiwara, T. Kunisue, S. Takahashi, P. H. Viet, B. C. Tuyen, S. Tanabe, Persistent Organic Pollutants in Sediments from Sai Gon-Dong Nai River basin, Vietnam: Levels and Temporal Trends, *Arch Environ Contam Toxicol*, Vol. 52, 2007, pp. 458-465.
- [15] P. M. Hoai, N. T. Ngoc, N. H. Minh, P. H. Viet, Recent Levels of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Sediments of the

- Sewer System in Hanoi, Vietnam, Environment Pollution, Vol. 158, 2010, pp. 913-920.
- [16] K. Naruse, M. Tanaka, H. Takeda, A Model for Organogenesis Human Disease and Evolution, Springer Publisher House, Japan, 2011, pp. 633.
- [17] M. Kasahara, K. Naruse, S. Sasaki, Y. Nakatani, W. Qu, B. Ahsan, The Medaka Draft Genome and Insights into Vertebrate Genome Evolution, Nature, Vol. 447, 2007, pp. 714-719.
- [18] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome, Nature, Vol. 496, 2013, pp. 498-503.
- [19] T. D. Long, V. T. Thu, T. T. Thuy, Zebrafish and Medaka Fish as Models for Research on Human Diseases, The Conference of Youth Science and Technology in Medicine and Pharmacy 2th, 2015 (in Vietnamese).
- [20] G. N. Sreeya, R. Radha, C. N. Radhakrishnan, Studies on Acute Toxicity to Pesticide Stress in a Freshwater Fish *Cirrhinus mrigala*, International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, Vol. 5, 2017, pp. 355-358.
- [21] M. Knöbel, F. J. M. Busser, A. R. Rico, N. I. Kramer, J. L. M. Hermens, C. Hafner, Predicting Adult Fish Acute Lethality with the Zebrafish Embryo: Relevance of Test Duration, Endpoints, Compound Properties, and Exposure Concentration Analysis, Environmental Science & Technology, Vol. 46, 2012, pp. 9690-9700.
- [22] N. X. Tong, T. T. T. Huong, M. Huong, D. T. Thuy, N. H. T. Vy, The Impact of o, p'- DDT Pesticide Toxicity on the Growth of Medaka Fish Embryo *Oryzias latipes*, Vietnam Journal of Marine Science and Technology, Vol. 20, 2020, pp. 73-81.
- [23] D. J. Finney, Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1971, pp. 50-80.
- [24] T. T. T. Huong, N. X. Tong, N. T. Binh, L. H. Anh, D. T. B. Hong, The Impact of o,p'- DDT Pesticide Toxicity on the Development of Fish Embryo *Oryzias curvinitus*, Journal of Biology, Vol. 41, 2019, pp. 337-344.
- [25] C. S. Qu, W. Chen, J. Bi, L. Huang, F. Y. Li, Ecological Risk Assessment of Pesticide Residues in Taihu Lake Wetland, China, Ecological Modelling, 2011, pp. 287-292.
- [26] W. W. Johnson, M. T. Finley: Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Department of the Interior Fish and Wildlife Service/Resource Publication 137, Washington DC, United states, 1980.
- [27] A. J. Kuhl, S. Manning, M. Brouwer, Brain Aromatase in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*): Molecular Characterization and Role in Xenoestrogen-induced Sex Reversal, The Journal of Steroid, Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 96, 2005, pp. 67-77.
- [28] L. Wua, H. Rua, Z. Nia, X. Zhang, H. Xiea, F. Yaoa, Comparative Thyroid Disruption by o,p'-DDT and p,p'-DDE in Zebrafish Embryos/Larvae, Aquatic Toxicology, Vol. 216, 2019, pp. 105280.
- [29] Y. S. Moon, H. J. Jeon, T. H. Nam, S. D. Choi, B. J. Park, Y. S. Ok, S. E. Lee, Acute Toxicity and Gene Responses Induced by Endosulfan in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos, Chemical Speciation & Bioavailability, Vol. 28, 2016, pp. 103-109.
- [30] W. S. Chow, W. K. L. Chan, K. M. Chan, Toxicity Assessment and Vitellogenin Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos and Larvae Acutely Exposed to Bisphenol A, Endosulfan, Heptachlor, Methoxychlor and Tetrabromobisphenol A, Journal of Applied Toxicology, Vol. 33, 2012, pp. 670-678.
- [31] Y. M. Velasco-Santamaría, R. D. Handy, K. A. Sloman, Endosulfan Affects Health Variables in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) and Induces Alterations in Larvae Development, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Vol. 153, 2011, pp. 372-380.
- [32] C. Teta, Y. S. Naik, Endosulfan Reduces Fertilization Success and Causes Abnormal Embryo Development to Zebrafish, Toxicological & Environmental Chemistry, 2018, pp. 1-21.
- [33] C. Aronzon, G. Svartz, C. P. Coll, Comparative Toxicity of Endosulfan and Diazinon on the Embryo-larval Development of the South American Toad, *Rhinella arenarum*, International Journal of Environment and Health, Vol. 8, 2017, pp. 225-234.
- [34] D. W. Sparling, G. M. Fellers, Toxicity of Two Insecticides to California, USA, Anurans and Its Relevance to Declining Amphibian Populations, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 28, 2009, pp. 1696.
- [35] Y.G. Piazza, M. Pandolfi, F. L. Lo Nostro, Effect of the Organochlorine Pesticide Endosulfan on GnRH and Gonadotrope Cell Populations in Fish Larvae, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, No. 61, 2010, pp. 300-310.
- [36] M. F. Khan, S. Tabassum, H. Sadique, M. Sajid, S. Ghayyur, K. Dil, Hematological, Biochemical

- and Histopathological Alterations in Common Carp During Acute Toxicity of Endosulfan, International Journal of Agriculture and Biology, Vol. 22, 2019, pp. 703-709.
- [37] M. Oliva, M. L. González de Canales, M. C. Garrido, S. Sales, Lindane Toxicity Range-finding Test in Senegal Sole (*Solea senegalensis*) Juvenile: Note on Histopathological Alterations, Toxicological & Environmental Chemistry, Vol. 92, 2010, pp. 915-926.
- [38] E. Lammer, G. J. Carr, K. Wendler, J. M. Rawlings, S. E. Belanger, T. Braunbeck, Is the Fish Embryo Toxicity Test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*) a Potential Alternative for the Fish Acute Toxicity Test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol, Vol. 149, 2009, pp. 196-209.
- [39] IARC, DDT, Lindane, and 2,4-D, Organization, WHO Press, France, 2018.
- [40] D. A. Goolsby, L. L. Boyer, G. E. Mallard, Persistence of Herbicides in Selected Reservoirs in the Midwestern United States: Some Preliminary Results, U. S. G. Survey Press, 1993, pp. 93-418.
- [41] T. D. Anderson, M. J. Lydy, Increased Toxicity to Invertebrates Associated with a Mixture of Atrazine and Organophosphate Insecticides, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 21, 2002, pp. 1507-1514.
- [42] R. A. Moreira, A. D. S. Mansano, L. C. D. Silva, O. Rocha, A Comparative Study of the Acute Toxicity of the Herbicide Atrazine to Cladocera *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*, Acta Limnologica Brasiliensia, Vol. 26, 2014, pp. 1-8.
- [43] A. Moore, N. Lower, I. Mayer, L. Greenwood, The Impact of a Pesticide on Migratory Activity and Olfactory Function in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Smolts, Aquaculture, Vol. 273, 2007, pp. 350-359.
- [44] K. Shenoy, Environmentally Realistic Exposure to the Herbicide Atrazine Alters Some Sexually Selected Traits in Male Guppies, PLoS One, Vol. 7, 2012, pp. e30611.
- [45] J. A. Cleary, D. E. Tillitt, F. S. V. Saal, D. K. Nicks, R. A. Claunch, R. K. Bhandari, Atrazine Induced Transgenerational Reproductive Effects in Medaka (*Oryzias latipes*), Environmental Pollution, Vol. 251, 2019, pp. 639-650.
- [46] Z. Liu, Z. Fu, Y. Jin, Immunotoxic Effects of Atrazine and Its Main Metabolites at Environmental Relevant Concentrations on Larval Zebrafish (*Danio rerio*), Chemosphere, Vol. 166, 2017, pp. 212-220.
- [47] K. R. Solomon, J. A. Carr, L. H. Du Preez, J. P. Giesy, R. J. Kendall, E. E. Smith, G. J. V. D. Kraak, Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review, Critical Reviews in Toxicology, Vol. 38, 2008, pp. 721-772.
- [48] T. Narahashi, Neurophysiological Effects of Insecticides, Handbook of Pesticide Toxicology, 2010, pp. 799-816.
- [49] T. H. T. Dang, L. T. Nguyen, D. T. Nguyen, Toxicological and Melanin Synthesis Effects of *Polygonum multiflorum* Root Extracts on Zebrafish Embryos and Human Melanocytes, Biomedical Research and Therapy, Vol. 3, 2016, pp. 808-818.
- [50] R. H. Peters, The Ecological Implications of Body Size, Cambridge University Press, The United Kingdom, 1986.