

# NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÁ NGỰA VẦN (*DANIO RERIO* HAMILTON, 1822) LÀM SINH VẬT CẢNH BÁO SỚM Ô NHIỄM NGUỒN NƯỚC CHO NHÀ MÁY NƯỚC CẤP

## A STUDY ON USING ZEBRA FISH (*DANIO RERIO* HAMILTON, 1822) AS EARLY WARNING ORGANISM FOR WATER POLLUTION FOR WATER SUPPLY PLANTS

Nguyễn Văn Khánh

Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng; vankhanhsk23@gmail.com

**Tóm tắt** - Bài báo cung cấp kết quả nghiên cứu hành vi của cá Ngựa vằn (*Danio rerio* Hamilton, 1822) để sử dụng làm sinh vật cảnh báo sớm ô nhiễm nguồn nước cho nhà máy nước cấp. Hành vi bơi của cá Ngựa vằn cho thấy ở mức độ ô nhiễm 10%  $LC_{50}$ -24h hoạt động bơi của cá gia tăng đáng kể, mức độ ô nhiễm từ 20%  $LC_{50}$ -24h trở lên, hoạt động bơi giảm dần. Do đó, cá Ngựa vằn có thể phát hiện chất ô nhiễm ở nồng độ 10%  $LC_{50}$ -24h (NaOCl) với sự thay đổi hành vi là gia tăng hoạt động bơi và suy giảm dần ở nồng độ 20%  $LC_{50}$ -24h trở lên so với hoạt động ở môi trường nước bình thường. Kết quả này cho thấy, việc sử dụng hệ thống phân mềm để nhận dạng thay đổi hành vi của cá Ngựa vằn trong các môi trường nước ô nhiễm khác nhau là hoàn toàn khả thi. Đây là nền tảng cơ bản để thiết lập hệ thống cảnh báo sớm ô nhiễm môi trường nước trong các nghiên cứu tiếp theo.

**Từ khóa** - cá Ngựa vằn; *Danio rerio*; ô nhiễm nguồn nước; sinh vật cảnh báo sớm.

**Abstract** - This paper aims to provide the result of study about behaviors of Zebra fish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) in order to assess the capacity of using this species as an early warning organism for water pollution for water supply plants. The result indicates that at 10%  $LC_{50}$ -24h of NaOCl, swimming behavior increases significantly in comparison with standard condition and at 20%  $LC_{50}$ -24h of NaOCl upwards, it shows a gradual decrease. Therefore, it is possible to use Zebra fish to detect pollutants with concentration that is equivalent to 10%  $LC_{50}$ -24h of NaOCl via observing changes in behaviors of fish. This study also indicates that using the software system to track the behavioral changes of fish in various contaminated environments is feasible and should be considered as the basis for further studies on monitoring water pollution by early warning organism in Vietnam.

**Key words** - Zebra fish; *Danio rerio*; water; pollution; early warning organism.

### 1. Mở đầu

Chất lượng nước thường xuyên bị ảnh hưởng bởi các quá trình bất lợi như suy thoái đất, biến đổi khí hậu, các tác động trực tiếp hay gián tiếp của con người [3]. Theo Viện Khoa học Sự sống Quốc tế [3], nhiều nhà quản lý nhà máy xử lý nước cấp nhận thấy rằng chất ô nhiễm từ nông nghiệp, nước thải chưa xử lý, ... là mối đe dọa hàng đầu đến việc cung cấp nước.

Việc áp dụng công nghệ sinh tin học để giám sát nguồn nước mặt ô nhiễm mang lại hiệu quả khả quan song vẫn còn rất mới mẻ ở Việt Nam. Hiện nay, nhiều nghiên cứu quan tâm đến việc dùng cá như một sinh vật chỉ thị (biomarker) cho việc giám sát ô nhiễm nguồn nước bằng cách phân tích hành vi để xác định nguồn nước bị ô nhiễm hay không. Ý tưởng là khi nguồn nước bị ô nhiễm, các chất ô nhiễm sẽ ảnh hưởng lên hoạt động của các vi sinh vật sống trong đó. Từ đó, bằng cách quan sát sự thay đổi hành vi của vi sinh vật ta có thể xác định sự ô nhiễm và các chất gây ô nhiễm.

Tuy nhiên, sinh vật được sử dụng với các phương pháp này thường thích nghi với điều kiện sống bản địa; việc tìm ra các sinh vật giống hệ như vậy để áp dụng cho bài toán ở Việt Nam là một vấn đề khó khăn bởi nhiều khả năng chúng không tồn tại trong điều kiện khí hậu ở Việt Nam.

Bài báo này cung cấp những kết quả trong việc “Nghiên cứu sử dụng cá Ngựa vằn (*Danio rerio*) làm sinh vật cảnh báo sớm ô nhiễm nguồn nước cho nhà máy nước cấp tại thành phố Đà Nẵng”. Bài báo này cung cấp các cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu, phân tích hành vi của cá Ngựa vằn (*Danio rerio*) trong môi trường nước sông thuận tủy và môi trường nước sông có chất giả ô nhiễm (NaOCl) với các nồng độ khác nhau, từ đó xét xem cá có thay đổi hành vi

bơi khi ở môi trường có chất ô nhiễm hay không. Đây là những dẫn liệu khoa học góp phần xây dựng chương trình ứng dụng sinh vật cảnh báo sớm, giám sát ô nhiễm nguồn nước tại Việt Nam.

### 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguồn nước được sử dụng trong thí nghiệm được lấy từ nguồn nước sinh hoạt của thủy cục và nguồn nước sông được thu ở đầu vào của nhà máy nước Cầu Đỏ, TP. Đà Nẵng.

Các loài cá thường được sử dụng cho nghiên cứu cảnh báo sớm là loài đã được biết rõ về đặc điểm sinh học, đã được nhân nuôi dễ dàng, kích thước đồng đều, chủ động về nguồn cung cấp. Nghiên cứu này loài cá được sử dụng là Cá ngựa vằn (*Danio rerio* Hamilton, 1822) thuộc bộ Cypriniformes (bộ cá chép), họ Cyprinidae (họ cá chép) và đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác. Cá được mua từ cửa hàng cá cảnh, thuần dưỡng trong bể 80 lít trong vòng 1 tuần. Trước khi làm thí nghiệm, ngừng cho ăn 24 giờ để hạn chế phân cá làm ô nhiễm nước khi tiến hành thí nghiệm.

#### 2.1. Thí nghiệm độc học $LC_{50}$ -24h

Thí nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) về hóa chất và cá trong thí nghiệm độc tính cấp tính:

Xác định  $LC_{50}$ -24h với dãy năm nồng độ natri hypoclorit (NaOCl) đối với cá Ngựa vằn: 33,33; 40,00; 51,67; 53,33; 58,33 mg/L và đối chứng (0 mg/L). Với mỗi nồng độ lặp lại 3 lô, mỗi lô có 10 cá thể/ 3lít nước. Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp tính trong 24h, sức khí thường xuyên. Thí nghiệm được theo dõi và ghi nhận số cá chết thường xuyên và vớt cá chết để hạn chế ảnh hưởng đến chất lượng nước. Các thông số môi trường: DO, nhiệt độ và pH được đo

vào lúc bắt đầu và kết thúc thí nghiệm, để theo dõi sự ảnh hưởng của các yếu tố đến kết quả thí nghiệm.

2.2. Thí nghiệm theo dõi sự thay đổi hành vi của cá

Dựa trên kết quả LC<sub>50</sub>-24h của cá, tiến hành thí nghiệm theo dõi sự thay đổi hành vi với các mẫu nước sau: nước cấp, nước sông, nước sông chứa 10% LC<sub>50</sub>-24h, 20% LC<sub>50</sub>-24h, 30% LC<sub>50</sub>-24h, 40% LC<sub>50</sub>-24h với tần suất lặp lại 3 lần cho mỗi thí nghiệm.

Bể thí nghiệm là bể hồi lưu, được làm bằng kính với dung tích 9 lít. Bóng đèn huỳnh quang được gắn phía trên mỗi bể để duy trì ánh sáng. Cá được nuôi thích nghi trong môi trường bể nước thí nghiệm 1 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm giám sát hành vi trong 5 giờ. Không cho cá ăn trong vòng 24h trước khi thực hiện thí nghiệm để tránh hiện tượng nước bị ô nhiễm do chất thải từ cá. Hoạt động bơi của cá sẽ được ghi lại bằng hai camera gắn ở phía trên và mặt bên của bể và truyền trực tiếp đến máy tính trung tâm. Dữ liệu hình ảnh được xử lý bằng phần mềm Matlab và xuất dữ liệu trên phần mềm Microsoft Excel để phân tích.

Bảng 1. Các thông số DO, Nhiệt độ, pH trong thời gian làm thí nghiệm LC<sub>50</sub>24h

| Chi tiêu<br>Lô | DO (mg/L)        |                 | Nhiệt độ (°C)    |                 | pH               |                 |
|----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                | Đầu vào<br>tb±sd | Đầu ra<br>tb±sd | Đầu vào<br>tb±sd | Đầu ra<br>tb±sd | Đầu vào<br>tb±sd | Đầu ra<br>tb±sd |
| ĐC (n = 3)     | 7,03±0,21        | 7,13±0,17       | 26,25±0,96       | 27,00±1,15      | 6,98±0,11        | 7,06±0,19       |
| NV1 (n = 3)    | 6,90±0,14        | 6,95±0,13       | 27,00±0,82       | 27,25±0,96      | 7,07±0,21        | 7,25±0,15       |
| NV2 (n = 3)    | 6,95±0,13        | 7,00±0,22       | 26,50±1,29       | 27,25±1,71      | 7,26±0,07        | 7,25±0,23       |
| NV3 (n = 3)    | 6,90±0,18        | 7,05±0,13       | 27,00±0,82       | 27,50±1,29      | 7,36±0,16        | 7,40±0,12       |
| NV4 (n = 3)    | 7,00±0,18        | 7,08±0,13       | 27,50±1,29       | 27,50±0,58      | 7,41±0,19        | 7,53±0,18       |
| NV5 (n = 3)    | 6,95±0,13        | 6,85±0,26       | 26,50±1,29       | 27,50±1,00      | 7,51±0,13        | 7,57±0,17       |

Sau 24 giờ tiếp xúc với hóa chất, ở nồng độ NaOCl thấp nhất (33,33 mg/L) tỷ lệ cá chết khoảng 2,50%, tỷ lệ cá chết tăng dần theo nồng độ NaOCl theo trình tự nồng độ càng cao tỷ lệ cá chết càng cao (Bảng 2) và cá chết cao nhất ở nồng độ cao nhất (58,33 mg/L) là 57,5%. Kết quả phân tích tương quan và hồi quy xác định nồng độ gây chết 50% số cá thể của NaOCl ở cá Ngựa vằn sau 24 giờ là 57,02 mg/L.

Bảng 2. Tỷ lệ cá Ngựa vằn chết theo nồng độ NaOCl và giá trị LC<sub>50</sub>-24h

|                              |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Nồng độ (mg/L)               | ĐC    | 33,33 | 40,00 | 51,67 | 53,33 | 58,33 |
| Tỷ lệ cá chết (%)            | 0     | 2,50  | 10,00 | 22,50 | 30,00 | 57,50 |
| LC <sub>50</sub> -24h (mg/L) | 57,02 |       |       |       |       |       |

3.2. Hành vi của cá Ngựa vằn trong môi trường nước cấp và nước sông không có NaOCl

Với mục tiêu hướng đến việc giám sát chất lượng nước đầu vào của nhà máy xử lý nước bằng hệ thống cảnh báo sớm, các thử nghiệm về hành vi của cá Ngựa vằn trong môi trường nước sạch (nước thủy cục đã khử Clo trong 24h và nước sông ở khu vực đầu vào của nhà máy cấp nước). Các thông số môi trường từ lúc tiến hành thí nghiệm đến khi thí nghiệm kết thúc liên tục được giám sát và cho thấy không có thay đổi về chất lượng nước ( $\alpha = 0,05$ ) (Bảng 3).

Bảng 3. Thông số đầu vào và đầu ra của thí nghiệm

| Lô thí nghiệm (n = 3) |         | DO (mg/L) | pH       | Nhiệt độ (°C) |
|-----------------------|---------|-----------|----------|---------------|
| Nước cấp              | Đầu vào | 5,9±0,15  | 6,6±0,1  | 31,0±1,0      |
|                       | Đầu ra  | 5,8±0,15  | 6,7±0,05 | 32,5±0,3      |

Hoạt động bơi của cá Ngựa vằn được xác định bằng cách theo dõi quãng đường di chuyển của cá trong bể thử nghiệm mỗi 5 phút và theo dõi liên tục trong 5 giờ. Các thông số môi trường: DO, nhiệt độ, pH được theo dõi trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý, thống kê và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel. So sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp phân tích ANOVA và kiểm tra LSD với mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ . Phân tích và vẽ biểu so sánh hành vi của cá bằng phần mềm Origin version 6.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định LC<sub>50</sub>-24h của NaOCl đối với cá Ngựa vằn

Các thông số môi trường: DO, nhiệt độ, pH được giám sát trong suốt quá trình thí nghiệm, nhằm theo dõi tính ổn định của môi trường nước thí nghiệm (Bảng 1). Kết quả cho thấy môi trường nước ổn định trong tất cả các lô và trong suốt thí nghiệm ( $\alpha = 0,05$ ).

|                           |         |          |          |          |
|---------------------------|---------|----------|----------|----------|
| Nước sông                 | Đầu vào | 5,3±0,10 | 6,9±0,1  | 30,8±1,0 |
|                           | Đầu ra  | 5,0±0,15 | 6,8±0,1  | 32,3±0,5 |
| 10% LC <sub>50</sub> -24h | Đầu vào | 6,2±0,15 | 7,1±0,1  | 31,0±1,5 |
|                           | Đầu ra  | 6,0±0,11 | 6,9±0,1  | 32,5±1,5 |
| 20% LC <sub>50</sub> -24h | Đầu vào | 6,3±0,10 | 7,0±0,1  | 32,3±0,5 |
|                           | Đầu ra  | 6,1±0,10 | 6,8±0,05 | 33,6±0,5 |
| 30% LC <sub>50</sub> -24h | Đầu vào | 6,2±0,15 | 7,2±0,1  | 31,0±1,5 |
|                           | Đầu ra  | 6,0±0,11 | 6,9±0,1  | 32,5±1,5 |
| 40% LC <sub>50</sub> -24h | Đầu vào | 6,3±0,10 | 7,0±0,1  | 32,3±0,5 |
|                           | Đầu ra  | 6,1±0,10 | 6,9±0,05 | 33,6±0,5 |

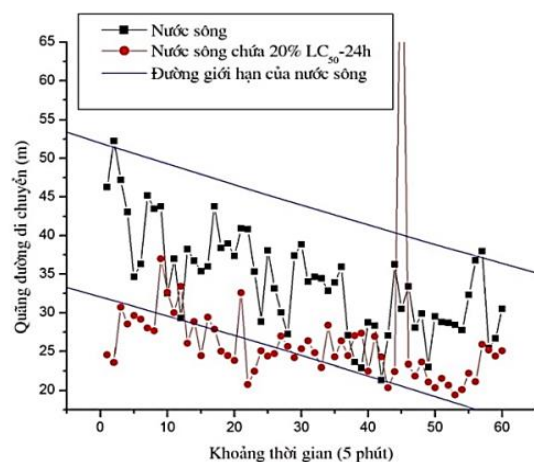
Kết quả phân tích Anova và kiểm tra LSD cho thấy (Bảng 4), quãng đường di chuyển của cá Ngựa vằn trong môi trường nước cấp và nước sông là không khác nhau (Hình 1.a). Trong khi đó, quãng đường di chuyển tăng cao khi ở nồng độ 10% LC<sub>50</sub> sau đó giảm dần theo sự gia tăng nồng độ của NaOCl trong các lô thí nghiệm. Ở 10% LC<sub>50</sub> cá Ngựa vằn di chuyển nhanh hơn so với môi trường nước sông, đây là hành vi “trốn chạy” của cá khi gặp điều kiện bất lợi (Hình 1.b). Và khi nồng độ NaOCl tăng lên khiến cá chuyển từ “trốn chạy” sang trạng thái ngộ độc cấp tính và giảm khả năng di chuyển. Ở 20% LC<sub>50</sub>-24h quãng đường di chuyển của cá là 1.590,02 ± 80,59m, trong khi quãng đường di chuyển của cá ở môi trường nước sông là 2.045,24 ± 359,46 m (Hình 1.c). Sự thay đổi hành vi bơi cũng được quan sát thấy ở nhóm thí nghiệm 30% ngay khi tiến hành thí nghiệm, cá bơi chậm hơn, quãng đường di chuyển ngắn hơn. Quãng đường di chuyển mỗi 5 phút của cá ở môi trường chứa 30%

LC<sub>50</sub>-24h thấp hơn ở môi trường nước sông và thấp hơn cả môi trường nước sông chứa 20% LC<sub>50</sub>-24h (Hình 1.d). Chứng tỏ tốc độ bơi của cá chậm lại khi ô nhiễm tăng lên ở mức 30% LC<sub>50</sub>-24h. Quảng đường di chuyển của cá Ngựa vằn ở môi trường nước sông chứa 40% LC<sub>50</sub>-24h có sự suy giảm so với quảng đường di chuyển trong môi trường đối chứng (môi trường nước sông). So sánh quảng đường di chuyển của cá trong môi trường chứa 40% LC<sub>50</sub>-24h với môi trường chứa 30% LC<sub>50</sub>-24h thì không thấy sự khác biệt về ý nghĩa ( $\alpha=0,05$ ) (Hình 1.e).

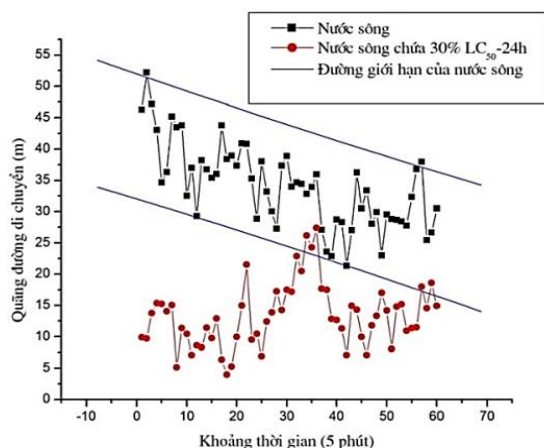
**Bảng 4.** Quảng đường di chuyển của cá Ngựa vằn trong các môi trường nước khác nhau

| Nghiem thứ           | Quảng đường trong 5 giờ (m)(n=3) | Quảng đường trong 5 phút (m)(n=3) |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Nước cấp             | 2.074,09 ± 211,32a               | 34,57 ± 3,52a                     |
| Nước sông            | 2.045,24 ± 359,46a               | 34,09 ± 5,99a                     |
| 10% LC <sub>50</sub> | 3.017,41 ± 96,84b                | 50,29 ± 1,61b                     |
| 20% LC <sub>50</sub> | 1.590,02 ± 80,59c                | 26,50 ± 1,34c                     |
| 30% LC <sub>50</sub> | 799,64 ± 226,32d                 | 13,33 ± 3,77d                     |
| 40% LC <sub>50</sub> | 701,66 ± 327,41d                 | 11,69 ± 5,46d                     |

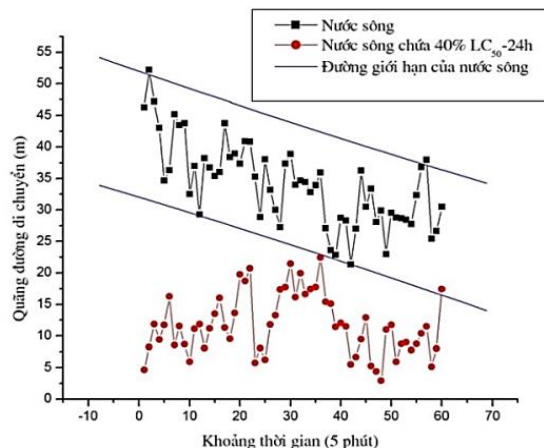
Ghi chú: Các giá trị trung bình có cùng chữ cái a, b, c, d ở cùng một cột không có sự khác nhau có ý nghĩa ( $\alpha=0,05$ )



(1.c)



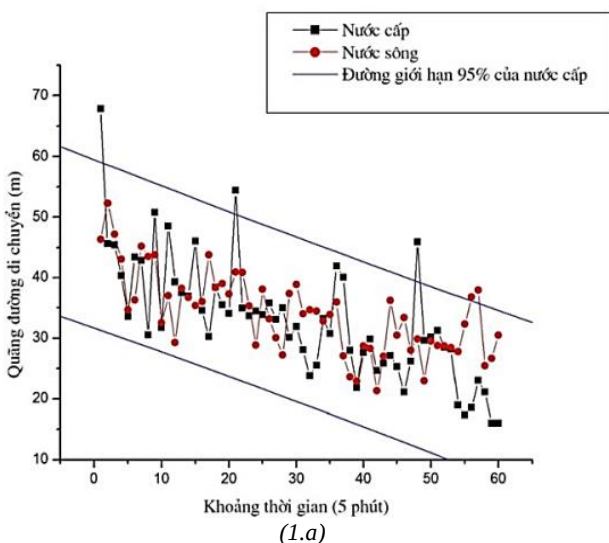
(1.d)



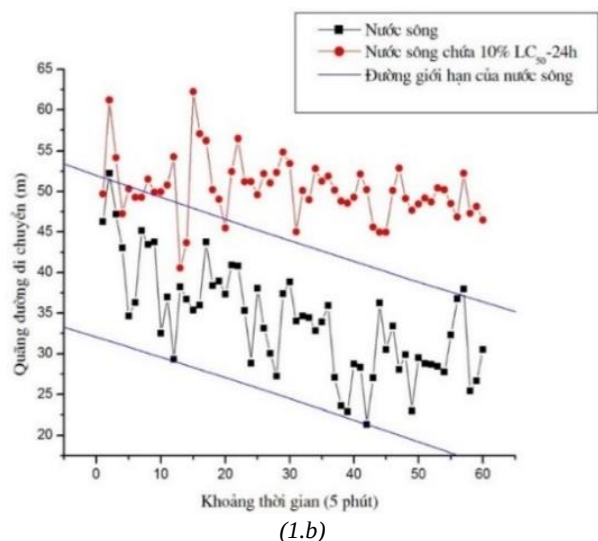
(1.e)

**Hình 1.** Quảng đường di chuyển của cá trong các môi trường nước khác nhau

Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy ở nghiên cứu của Little và cộng sự [4], hoạt động bơi của cá tăng ở ngưỡng ô nhiễm thấp sau đó suy giảm khi cá tiếp xúc với những nồng độ cao hơn của DEF (photpho hữu cơ làm rụng lá) hay 2,4-DMA ở nồng độ cao (5 - 50% LC<sub>50</sub>), một nghiên cứu khác ở cá vược mặt trời (Bluegill) cũng đã chứng minh điều tương tự, chuyển động của toàn bộ cơ thể cá suy giảm khi có sự gia tăng nồng độ chất ô nhiễm [2]. Việc suy giảm hành vi bơi có thể là một hành vi thích ứng về mặt sinh lý làm giảm hoạt động trao đổi chất cân bằng nội môi từ đó giảm nguy cơ tử vong [5].



(1.a)



(1.b)

#### 4. Kết luận

Qua các kết quả thu được, xác định được  $LC_{50}$ -24h của NaOCl đối với cá Ngựa vằn là 57,02 mg/L. Nghiên cứu về hành vi bơi của cá Ngựa vằn cho thấy ở mức độ ô nhiễm 10%  $LC_{50}$ -24h hoạt động bơi của cá gia tăng đáng kể, mức độ ô nhiễm từ 20%  $LC_{50}$ -24h trở lên hoạt động bơi giảm dần. Khi tiến hành so sánh ANOVA và phân tích LSD với mức ý nghĩa  $\alpha=0,05$  nhận thấy quãng đường di chuyển của cá đã có sự sai khác rõ rệt so với môi trường nước sông. Do đó, cá Ngựa vằn có thể phát hiện chất ô nhiễm ở nồng độ 10%  $LC_{50}$ -24h (NaOCl) với sự thay đổi hành vi là gia tăng hoạt động bơi và suy giảm dần ở nồng độ 20%  $LC_{50}$ -24h trở lên so với hoạt động ở môi trường nước bình thường.

Kết quả này cho thấy, việc sử dụng hệ thống phần mềm để nhận dạng thay đổi hành vi của cá Ngựa vằn trong các môi trường nước ô nhiễm khác nhau là hoàn toàn khả thi. Đây là nền tảng cơ bản để thiết lập hệ thống cảnh báo sớm ô nhiễm môi trường nước trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Danielly de Paiva Magalhães, Rodolfo Armando da Cunha, Jose Augusto Albuquerque dos Santos. Behavioral response of Zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822 to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. Springer Science+Business Media, LLC 2007.
- [2] Finger SE, Little EE, Henry MG, Fairchild JF, Boyle TP (1985). Comparison of laboratory and field assessment of fluorine, part I: Effects of fluorine on the survival, growth, reproduction, and behavior of aquatic organisms in laboratory tests. In: Boyle TP (ed) Validation and Predictability of laboratory methods for assessment the fate and effects of contaminants in aquatic ecosystems. STP 865. *American Society for Testing and materials*, Philadelphia, PA, pp 120–133.
- [3] ILSI. (1999). Early warning monitoring to detect hazardous events in water supplies. *ILSI Press*, Washington, D.C.
- [4] Little EE, Archeski RD, Flerox BA, Kozlovskaya VI (1989). Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch Environ Con Tox* 19(3):380–385.
- [5] Schreck CB, Olla BL, Davis MW (1997) Behavioral response to stress. In: Iwama GK, Pickering AAD, Sumpter JP, Schreck CB (eds) Fish stress and health in aquaculture. *Cambridge Univ Press*, Cambridge, pp 145–170.

(BBT nhận bài: 20/04/2017, hoàn tất thủ tục phản biện: 05/06/2017)