

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ HÓA CHẤT BẢO VỆ THỰC VẬT  
TỚI ADN VÀ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA PHÔI HẦU THÁI BÌNH DƯƠNG  
(*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793)**

**EMBRYOTOXICITY AND GENOTOXICITY EFFECTS OF PESTICIDES ON DNA AND  
EARLY LIFE STAGES OF PACIFIC OYSTER (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793)**

**Mai Hương<sup>1</sup>, Cao Văn Hạnh<sup>2</sup>, Chu Chi Thiết<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Huệ<sup>3</sup>**

Ngày nhận bài: 1/12/2017; Ngày phản biện thông qua: 20/12/2017; Ngày duyệt đăng: 29/12/2017

**TÓM TẮT**

Trong quá trình sản xuất nông nghiệp, một lượng lớn hóa chất bảo vệ thực vật đã được sử dụng và các hóa chất này không chỉ tiêu diệt, gây độc cho các sinh vật gây hại mà còn ảnh hưởng tới các sinh vật khác trong hệ sinh thái. Nghiên cứu này bước đầu khảo sát ảnh hưởng của một số hóa chất bảo vệ thực vật, bao gồm Atrazine, Alachlor, Diuron và Tributyltin (TBT) tới ADN và tới phát triển của phôi loài hầu Thái Bình Dương. Phôi hầu sau khi được ấp 24h trong môi trường nước biển có các hóa chất bảo vệ thực vật ở nồng độ khác nhau được so sánh với phôi được ấp trong nước biển sạch không chứa hóa chất bảo vệ thực vật (đối chứng). Kết quả cho thấy ở nước biển có nồng độ 1,8 µg/L Atrazine, và 1 µg/L Alachlor hay TBT thì tỷ lệ phôi ở giai đoạn chữ D có tỉ lệ dị thường nhiều hơn so với phôi được ấp trong nước biển sạch ( $p < 0,05$ ). Trong khi đó Diuron thể hiện độc lực yếu hơn đến sự phát triển của phôi hầu, trong đó nước biển có nồng độ Diuron là 4 µg/L đã làm tăng tỷ lệ phôi chữ D dị thường so với phôi ở đối chứng ( $p < 0,05$ ). Thí nghiệm phơi nhiễm với nước biển có nồng độ Diuron là 0,04 µg/L và TBT là 0,01 µg/L cho thấy tỷ lệ cấu trúc DNA trong tế bào của phôi hầu bị phá vỡ cao hơn so với công thức đối chứng ( $p < 0,001$ ) và tỉ lệ này tiếp tục tăng cao theo nồng độ của các hóa chất trong môi trường khi áp nở. Nhìn chung, các hóa chất bảo vệ thực vật có ảnh hưởng rõ rệt đến vật liệu di truyền ADN và sự phát triển của phôi hầu Thái Bình Dương dù ở hàm lượng rất thấp trong môi trường nước.

Từ khóa: Atrazine, Alachlor, Diuron, TBT, *Crassostrea gigas*.

**ABSTRACT**

Today, due to the increase of the production in agriculture, large amounts of pesticide residuals are released into the environment. It is well known that pesticides not only affect target organisms but also have some side effects on non-target organisms. Thus, the study aimed to evaluate the adverse effects of several common pesticides (Atrazine, Alachlor, Diuron and TBT) on a model bivalve species *Crassostrea gigas*, using the embryotoxicity test and the comet assay in early life stage. The results showed that embryotoxicity was observed from the lowest concentration of 1.8 µg/L ( $p < 0.05$ ) for Atrazine and 1.0 µg/L for Alachlor and/or TBT, while Diuron showed less toxic to oyster embryo, with concentration of 4 µg/L ( $p < 0.05$ ). Genotoxicity by comet assay is used in the study to assess how pesticides, Diuron and TBT, affect to DNA strand breaks. DNA strand breaks were detected at very low concentration of TBT and Diuron, with 0.01 µg/L ( $p < 0.001$ ) and 0.04 µg/L ( $p < 0.001$ ), respectively. The percentages of DNA strand breaks increased with the increased concentrations of each pesticide. Thus the detection of embryotoxicity and DNA strand breaks in this study demonstrated the toxic potential of those pesticides to bivalve species, even at low concentration in the environment.

Keywords: Atrazine, Alachlor, Diuron, TBT, Pacific oyster

<sup>1</sup> Khoa Nước, Môi trường và Hải dương học, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

<sup>3</sup> Viện Công nghệ và Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong sản xuất nông nghiệp, một lượng lớn hóa chất bảo vệ thực vật đã và đang gây ô nhiễm môi trường. Dư lượng các hóa chất bảo vệ thực vật trong các thủy vực thường xuyên được phát hiện và ghi nhận nhiều năm qua. Theo Bộ NN & PTNT (2010), có tới hàng trăm loại hóa chất bảo vệ thực vật được phép sử dụng trong sản xuất nông nghiệp, trong đó Atrazine, Alachlor và Diuron là thuốc diệt cỏ cho nhiều loại cây trồng như mía, ngô, lúa, đậu tương, lạc, bắp cải,.. Ngoài ra, hóa chất Tributyltin (TBT) là thành phần chính trong sơn chống bám bề mặt dùng trong công nghiệp đóng tàu đã bị cấm sử dụng ở nhiều nước trên thế giới từ năm 2003, nhưng dư lượng của nó vẫn được phát hiện trong môi trường tại Việt Nam. Hiện nay, Diuron được dùng thay thế TBT trong công nghiệp sản xuất sơn chống bám vỏ tàu (Gatidou và Thomaidis, 2007). Nhiều nghiên cứu chứng minh các loại hóa chất bảo vệ thực vật này có tác động xấu đến sinh trưởng và phát triển của các loài sinh vật thủy sinh, các hệ sinh thái thủy vực cả nước mặn và nước ngọt (Ruiz và cs, 1995; Scahill, 2008; Yi và cs, 2007; Russo và cs, 2004). Hầu hết chúng có khả năng gây độc và làm tổn thương tới vật liệu di truyền-ADN của các loài sinh vật thủy sinh. Chúng không chỉ gây độc cho các sinh vật có hại mà còn ảnh hưởng tới nhiều sinh vật có lợi khác trong tự nhiên (David, 1994; Joy và cs, 2005). Do đó, một số nghiên cứu đã sử dụng một số loài sinh vật thủy sinh làm sinh vật chỉ thị để giám sát và đánh giá ảnh hưởng dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật và chất tẩy rửa trong các thủy vực (Manzo và cs, 2006; Morin và cs, 2011; Quiniou và cs, 2005). Khả năng gây độc của các hợp chất này đã được nghiên cứu trên một số loài thủy sinh nước ngọt, nhưng trên động vật nhuyễn thể nước mặn vẫn còn rất hạn chế. Do đó, nghiên cứu này bước đầu

đánh giá độc lực của các hợp chất bảo vệ thực vật, gồm Atrazine, Alachlor, Diuron và TBT tới vật liệu di truyền và sự phát triển phôi của hàu Thái Bình Dương (*Crassostrea gigas*) trong môi trường nhân tạo.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Hóa chất và nước biển

Các hợp chất bảo vệ thực vật Atrazine (2-chloro-4-ethylamin-6-isopropylamino-ssss-triazine), Alachlor (6'-diethyl-N-(methoxymethyl) acetanilide), Diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) và TBT (tributyltin chloride) được mua từ công ty hóa chất Sigma-Alodrich Chemical. Các hóa chất khác dùng trong thí nghiệm bao gồm enzyme Dispace II, Triton X-100, LMP agarose, NMP agarose, MEM-alpha (Minimum Essential Medium) được mua từ công ty Gibco (Invitrogen, Cergy Pontoise).

Nước biển sử dụng trong các thí nghiệm là nước biển nhân tạo (oossl). Nước biển này được dùng làm mẫu đối chứng (không chứa hóa chất bảo vệ thực vật) và sử dụng làm môi trường nền để pha chế hóa chất bảo vệ thực vật theo yêu cầu thí nghiệm (Bảng 1).

### 2. Mẫu vật hàu thái bình dương

Hầu bố mẹ (*Crassostrea gigas*) được mua từ trại sản xuất giống nhuyễn thể Cửa Lò, Nghệ An. Các mẫu hàu được bảo quản ở 10°C trong quá trình vận chuyển và sau đó được thả vào nước biển để làm quen với môi trường trước khi tiến hành thí nghiệm. Mẫu hầu bố mẹ được sử dụng trong vòng 3 ngày sau khi nhập về phòng thí nghiệm.

### 3. Chuẩn bị môi trường thí nghiệm

Dung dịch thuốc diệt cỏ được pha từ hóa chất diệt cỏ nguyên chất (> 98%). Dung dịch hóa chất gốc của Atrazine và Diuron (100 mg/L) được pha bằng DMSO (dimethyl suloxide), trong khi đó dung dịch hóa chất gốc

(100 mg/L) của Alachlor và TBT được pha bằng nước cất Milli-Q. Sau đó các dung dịch hóa chất gốc này được pha trong nước biển để có được dãy nồng độ thí nghiệm. Mỗi loại

hóa chất trừ cỏ được thí nghiệm ở 4 nồng độ (đối với TBT và Diuron) hoặc 5 nồng độ khác nhau (đối với Atrazine và Alachlor) như trong Bảng 1.

**Bảng 1. Dãy nồng độ các hóa chất dùng trong thí nghiệm ảnh hưởng tới sự hình thành phôi giai đoạn chữ D (I) và ADN trong quá trình phát triển phôi (II)**

Tên hóa chất	Thí nghiệm (I)	Thí nghiệm (II)
Atrazine	0,0018; 0,018; 0,18; 1,8 và 18 µg/L	-
Alachlor	0,001; 0,01; 0,1; 1 và 10 µg/L	-
TBT	0,01; 0,1; 1 và 10 µg/L	0,01; 0,1; 1 và 10 µg/L
Diuron	0,04; 0,4; 4 và 40 µg/L	0,04; 0,4; 4 và 40 µg/L

**4. Thí nghiệm ảnh hưởng của độc tố đến sự phát triển phôi hầu (giai đoạn chữ D)**

Khi hầu bố mẹ bắt đầu sinh sản, tách hầu bố và hầu mẹ riêng rẽ vào 2 bình thủy tinh có chứa nước biển đã lọc. Hầu bố mẹ được kích thích sinh sản bằng phương pháp sốc nhiệt (30 phút thay đổi một lần hầu bố mẹ trong nước biển giữa các nhiệt độ 18°C và 28°C hoặc có thể giải phẫu tuyến sinh dục để cho thụ tinh nhân tạo. Hầu bố mẹ được để cho sinh sản khoảng 15 phút và sau đó thu trứng và tinh trùng. Trứng được lọc qua lưới lọc có kích thước 100 µm và tinh trùng lọc qua lưới 50 µm. Tính di động của tinh trùng và mật độ trứng được kiểm tra và đếm dưới kính hiển vi. Trứng được thụ tinh với tinh trùng với tỷ lệ 1:10 (trứng: tinh trùng). Dùng kính hiển vi để xác định việc thụ tinh đã thành công, và sau đó phôi được đếm và chuyển tới microplate có 24 ô nhỏ có chứa dung dịch hóa chất bảo vệ thực vật ở 5 nồng độ khác nhau cho Atrazine và Alachlor, ở 4 nồng độ khác nhau cho Diuron và TBT.

Thí nghiệm này được thực hiện theo phương pháp của Mai và cs (2012); Quiniou và cs (2005). Trứng đã thụ tinh (500 trứng)

được ấp trong đĩa lòng có 24 giếng, mỗi giếng chứa 1.8 ml dung dịch có chứa một trong các hóa chất nêu trên. Các microplate được để trong tủ ấp ở nhiệt độ 24°C trong 24 giờ. Sau khi ấp, phôi phát triển đến giai đoạn chữ D, được cố định bằng cách thêm 50 µL formalin 1%. Dùng pipet hút ngẫu nhiên 100 phôi để quan sát dưới kính hiển vi (Olympus, phóng đại 200 lần) nhằm xác định tỷ lệ phần trăm phôi chữ D có hình dạng dị thường. Phôi chữ D có hình dạng không bình thường được xác định dựa trên các tiêu chí như mô tả chi tiết trong His và cs (1999); Quiniou và cs (2005).

**5. Ảnh hưởng của hợp chất Diuron và TBT đến vật liệu di truyền ADN giai đoạn phôi của hầu TBD (Genotoxicity – Comet assay)**

Với thí nghiệm này, trứng đã được thụ tinh (1.000.000 trứng) ấp trong bình thủy tinh 250 mL trong 16h ở nhiệt độ 24°C. Mỗi một thí nghiệm thực thí nghiệm bố trí 3 lần lặp lại. Phôi chưa hình thành vỏ được phân tích ADN bằng enzyme Dispase II.

Tách chiết ADN được thực hiện trước khi tiến hành phân tích “comet” theo như phương pháp của Akcha và cs (2003) với

một vài thay đổi. Phôi sau khi ấp 16 giờ sẽ được lọc qua lưới lọc có kích cỡ 40  $\mu\text{m}$  và sau đó được rửa bằng 5 mL dung dịch MEM (Minimum Essential Medium). Sử dụng 1 mL dung dịch phôi cùng với 1 mL dung dịch enzyme Dispase II có nồng độ 1 g/L (Dispase II được pha trong dung dịch MEM) ấp trong 20 phút ở điều kiện nhiệt độ 37°C và rung nhẹ (150 rpm). Phản ứng giữa enzyme với phôi được dừng lại bằng cách ly tâm 1000 rpm trong vòng 10 phút ở 20°C. Sau đó, dung dịch có chứa enzyme được loại bỏ và giữ lại phần tế bào lắng đọng trong ống nghiệm (chỉ chứa dung dịch MEM). Xác định tế bào sống cho mỗi mẫu bằng dung dịch Trypan-blue. Thí nghiệm “comet” chỉ được thực hiện khi quan sát thấy có trên 80% tế bào sống của mỗi mẫu.

Quá trình bố trí thí nghiệm “comet” được thực hiện theo như mô tả của Morin và cs (2011) với một vài thay đổi. Chuẩn bị sẵn 3 bản kính cho mỗi công thức thí nghiệm trong đó mỗi bản kính sẽ có 2 điểm lắng tế bào. Các bản kính được xử lý kiềm bằng dung dịch điện di trong 20 phút để ADN được tách ra và điện di ở 25V và 300 mA.

Khi các tiêu bản đã khô, tiến hành quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi Olympus BX51. Phân tích ADN của tế bào (Komet 5.5, Kinetic Imaging Ltd.) để xác định tỷ lệ phần trăm ADN bị gãy trong phần đuôi (% Tail ADN) trong tế bào (Morin và cs, 2011). Phân tích mức độ gãy ADN của 100 tế bào trên 2 điểm lắng tế bào của mỗi tiêu bản phôi.

### 6. Xử lý số liệu

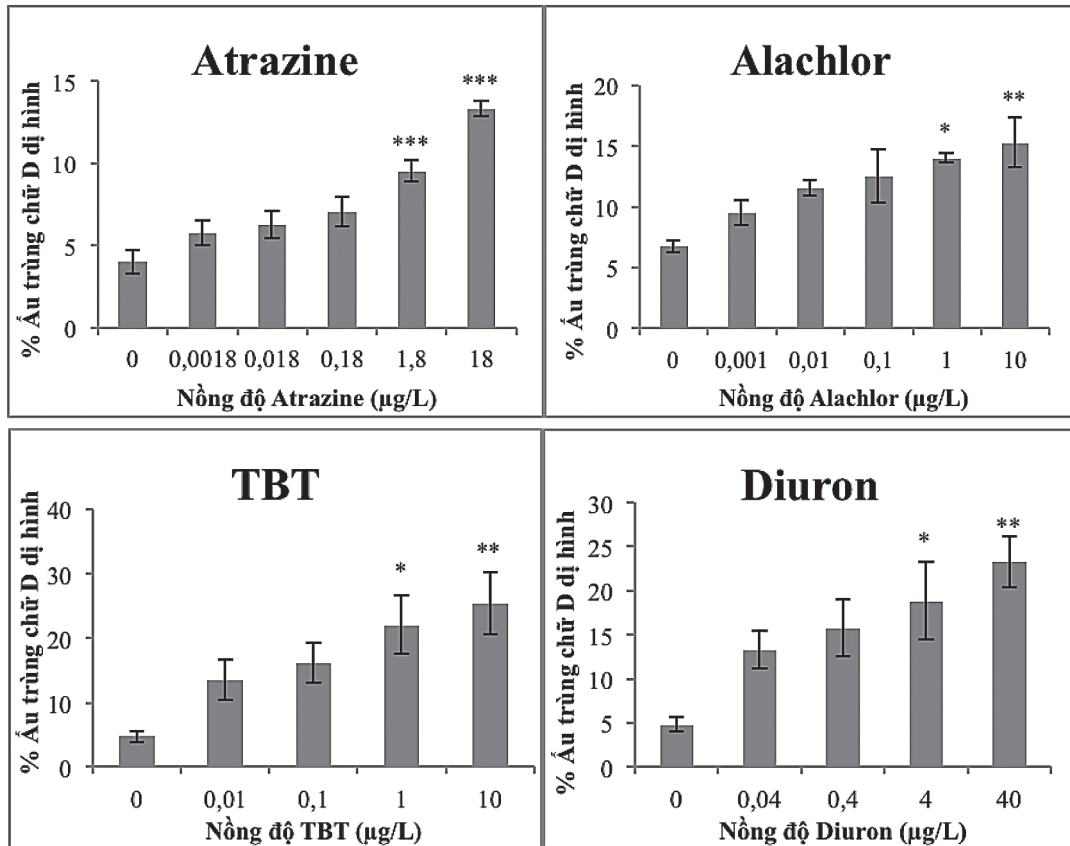
SPSS (16.0) và Microsoft Excel (2010) được sử dụng để phân tích số liệu. Trước khi phân tích ANOVA, các số liệu được kiểm tra về độ đồng nhất bằng Levene'test.

Các số liệu được thể hiện là trung bình của các lần lặp lại của mỗi công thức thí nghiệm. Tukey's test *post hoc* được sử dụng để xác định sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm cho từng loại hóa chất bảo vệ thực vật dùng trong nghiên cứu.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Ảnh hưởng của các hợp chất bảo vệ thực vật đến sự hình thành phôi hữu giai đoạn chữ D

Atrazine và Alachlor là một trong nhóm hóa chất bảo vệ thực vật được sử dụng phổ biến trên thế giới cho các hoạt động sản xuất nông nghiệp như trồng ngô và đậu tương. Atrazine thuộc nhóm hoá chất bảo vệ thực vật triazine và kết quả của các nghiên cứu trong hơn 2 thập kỷ qua đã chỉ ra rằng atrazine là một hợp chất được phát hiện thấy phổ biến ở các hệ thống sông suối (Comber, 1999; Fischer-Scherl và cs, 1991; Vryzas và cs, 2011). Atrazine cũng được biết là hóa chất gây ô nhiễm ở nhiều thủy vực (Phyu và cs, 2006). Trong khi đó Alachlor thuộc nhóm hóa chất chloroacetanilide dùng để diệt cỏ và có thể bị mưa rửa trôi đi vào trong các thủy vực. Từ năm 1977, hóa chất này đã được đánh giá là độc tố cản trở sự sinh trưởng của một số loài tảo (Hawxby và cs, 1977). Điều này được tái khẳng định trong một loạt nghiên cứu sau đó (Anton và cs, 1993; Kang và cs, 2005; Yi và cs, 2007). Các tác giả này đều đã ghi nhận Alachlor là hóa chất gây độc cho các sinh vật thủy sinh sau khi sử dụng hóa chất này trong sản xuất nông nghiệp. Tuy nhiên, chưa có đánh giá ảnh hưởng gây độc của hóa chất này tới các loài động vật thân mềm 2 mảnh vỏ biển, đặc biệt là với hàu Thái Bình Dương một loài sinh vật chỉ thị thường được dùng phổ biến trong các nghiên cứu về độc tố sinh thái.

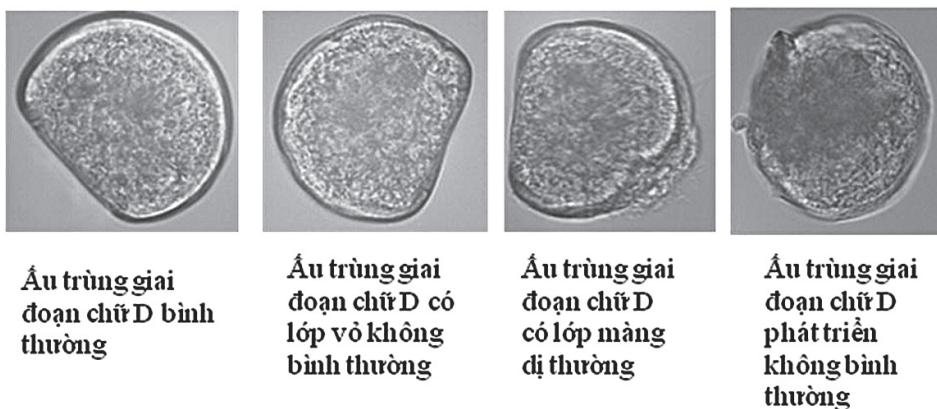


Hình 1: Tỷ lệ phần trăm các phôi chữ D có hình dạng dị thường sau khi được ấp 24 giờ trong nước biển có Atrazine, Alachlor, TBT và Diuron ở các nồng độ khác nhau.

Ghi chú: Giá trị là trung bình của các lần lặp lại (Mean ± SE). Sai khác có ý nghĩa so với đối chứng ở (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  và (\*\*\*)  $p < 0,001$

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng với nồng độ Atrazine và Alachlor trong nước biển rất thấp (chỉ 1 µg/L cho Alachlor và 1,8 µg/L cho Atrazine,  $p < 0,05$ ) đã bắt đầu ảnh hưởng tới tỷ lệ dị hình của phôi hầu giai đoạn

chữ D (Hình 1). Tỷ lệ phôi chữ D dị thường đã tăng tới 13,25% khi ấp trong môi trường nước biển có Atrazine ở nồng độ 18 µg/L ( $p < 0,001$ ) và 15,25% khi ấp ở nồng độ Alachlor là 10 µg/L ( $p < 0,01$ ) so với công thức đối chứng.



Hình 2: Phôi giai đoạn chữ D bình thường và dị thường

Alvarez và Fuiman (2005) phát hiện rằng Atrazine đã ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi cá đù đỏ *Sciaenops ocellatus*. Atrazine ảnh hưởng 5% phôi cá tuế *Pimephales promelas* phát triển không bình thường dù ở nồng độ 20 µg/L (Scahill, 2008). Sự phát triển của microcosms bắt đầu bị ảnh hưởng khi Atrazine trong nước là 5 µg/L (van den Brink và cs, 1995) và (NOEC-No Observed Effective Concentration) được ghi nhận không bị ảnh hưởng ở nồng độ 2,9 µg/L (Hartgers và cs, 1998). Như vậy, phôi hầu Thái Bình Dương nhạy cảm với Atrazine hơn các loài động vật thủy sinh khác. Tương tự, Alachlor cũng có ảnh hưởng tới sự phát triển của hầu giai đoạn chữ D hơn là tới các loài thủy sinh khác. Trong nghiên cứu ảnh hưởng của Alachlor tới sự phát triển của phôi cóc *Bombina orientalis* thì nồng độ Alachlor là 5 µM mới phát hiện tỷ lệ phôi dị thường cao hơn so với đối chứng với tỷ lệ là 18,97% ( $p < 0,05$ ) (Kang và cs, 2005). Nghiên cứu trên phôi cua *Rhithropanopeus harrisi* cho thấy, ở nồng độ Alachlor 10 mg/L bắt đầu có ảnh hưởng tới sự phát triển của phôi này (Takacs và cs, 1988). Tương tự, ảnh hưởng của Alachlor tới hoạt động của các enzyme trong cá *Carassius auratus* cũng được phát hiện ở nồng độ 1 µg/L (Yi và cs, 2007).

Tributyltin (TBT) là một hóa chất rất độc được dùng như là một thành phần trong sơn chống bám vỏ tàu biển từ những năm 1960 và dư lượng của nó đã trở thành nguồn gây ô nhiễm chính cho các hệ sinh thái thủy sinh. Ruiz và cs (1995) đã chỉ ra rằng, ở nồng độ 0,5 µg/L TBT có tới 85% phôi *Scrobicularia plana* bị dị hình. TBT ở nồng độ 11 µg/L đã ảnh hưởng tới 50% sự phát triển của *Vibrio fischeri*, nồng độ 3-7 µg/L cản trở sự phát triển của *Selenastrum capricornutum* và nồng độ  $0,8 \cdot 10^{-6}$  µg/L ảnh hưởng bất lợi tới *Daphnia magna* (Fernández-Alba và cs, 2002). Gần đây Bellas và cs (2005) đã báo cáo rằng chỉ với nồng độ 0,309 µg/L TBT trong nước biển đã khiến cho 50% phôi nhím biển *Paracentrotus lividus* có

hình dạng dị thường. Trong nghiên cứu này, hàm lượng 1 µg/L TBT trong nước biển đã làm tăng tỷ lệ phôi hầu giai đoạn chữ D dị hình so với đối chứng ( $p < 0,05$ ), với tỷ lệ là 22% (Hình 1). Kết quả này cho thấy nồng độ gây độc (dị hình) cho phôi hầu cao hơn so với các loài thủy sinh khác.

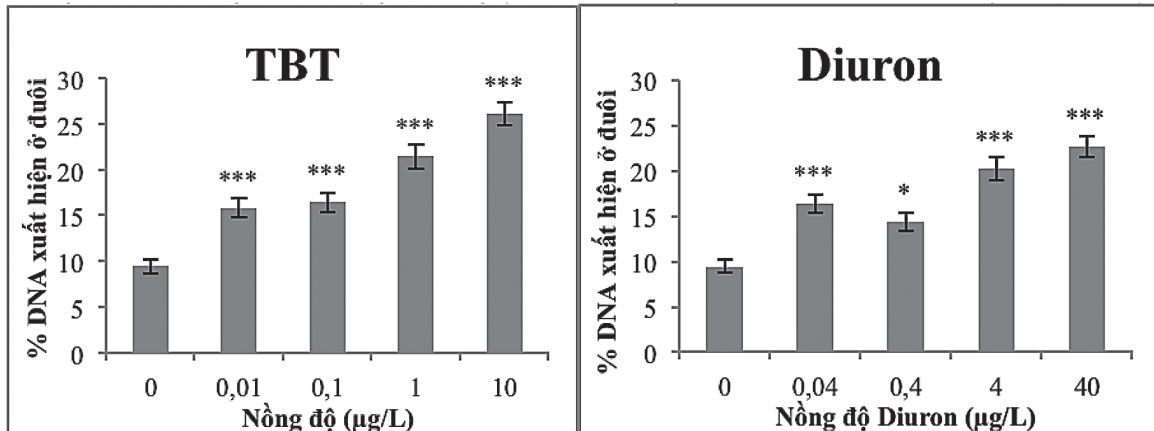
Diuron ngoài việc sử dụng trong các hoạt động sản xuất nông nghiệp thì nó còn được sử dụng trong công nghệ sơn chống lại các sinh vật bám gây làm hư hỏng thuyền. Hóa chất TBT bị tổ chức Hàng hải quốc tế cấm sử dụng từ năm 2003. Trong thí nghiệm này, Diuron ở nồng độ 4 µg/L mới bắt đầu gây ra những ảnh hưởng tới sự hình thành phôi chữ D với tỷ lệ dị hình là 18,75% ( $p < 0,05$ ). Ở nồng độ Diuron 40 µg/L thì tỷ lệ dị hình phôi chữ D là 23,25% ( $p < 0,01$ ; Hình 1). Theo nghiên cứu của Mai và cs (2013), nồng độ Diuron ảnh hưởng 50% ( $EC_{50}$ ) tới sự phát triển của ấu trùng hầu là 2332 µg/L. Tuy nhiên, nồng độ Diuron thấp nhất (LOEC) có ảnh hưởng tới sự phát triển của *Daphnia magna* là 350 µg/L (Fernández-Alba và cs, 2002) hay phôi nhím biển *Paracentrotus lividus* là 500 µg/L (Manzo và cs, 2006). Do vậy, so với loài giáp xác và nhím biển thì Diuron bắt đầu có ảnh hưởng độc hại cho sự hình thành phôi ở giai đoạn D của hầu Thái Bình Dương ở nồng độ thấp hơn.

## 2. Ảnh hưởng của các hợp chất bảo vệ thực vật đến ADN (di truyền học) của phôi hầu

Nhiều các nghiên cứu đã chứng minh rằng môi trường nhiễm TBT có thể gây ra các tổn thương cho yếu tố di truyền (ADN) của các sinh vật sống trong môi trường đó. Ảnh hưởng của TBT tới yếu tố di truyền đã được nghiên cứu trong nhiều thập kỷ qua; ví dụ như sự tổn thương ADN trong tế bào của phôi giun nhiều tơ *Platynereis dumerilli* (Jha và cs, 2000) hay trong tế bào hemocytes vẹm xanh trưởng thành *Mytilus edulis* (Hagger và cs, 2005). Nghiên cứu này dùng “comet assay” để đánh giá ảnh hưởng của TBT đến ADN của phôi hầu

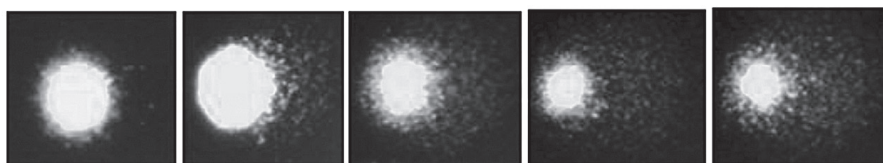
(Hình 4 và 5). Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy 0,01 µg/L TBT đã làm cho tỷ lệ tổn thương ADN trong tế bào của phôi hầu cao hơn so với đối chứng ( $p < 0,001$ ). Tuy nhiên, trong nghiên cứu ảnh hưởng của TBT tới

haemocytes của vẹm xanh trưởng thành (*Mytilus edulis*), Hagger và cs (2005) ghi nhận ở môi trường có hàm lượng TBT 0,5 µg/L mới gây ra tổn thương ADN ở tế bào (cao hơn nghiên cứu này).

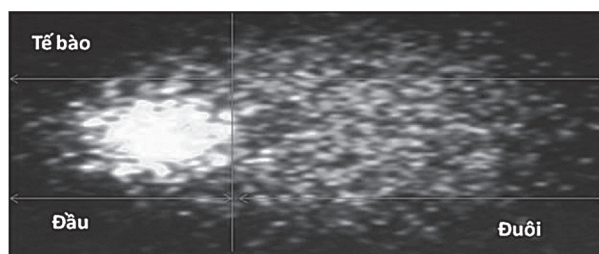


Hình 3: Tỷ lệ phần trăm mean ± S.E ADN xuất hiện trong đuôi sau khi áp 16 giờ trong nước biển có TBT và Diuron ở các nồng độ khác nhau.

Ghi chú: Sai khác có ý nghĩa so với đối chứng ở (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$  và (\*\*\*)  $p < 0,001$



Hình 4: Các mức độ ADN bị gãy tạo thành đuôi ADN trong tế bào của phôi hầu sau khi áp trong môi trường có các độc tố TBT (0 – 10 µg/L) và Diuron (0,04 – 40 µg/L)



Hình 5: Tỷ lệ xuất hiện vệt ADN ở đầu (Head DNA) và đuôi (Tail DNA) của nhân tế bào

Cho đến nay, có rất ít các nghiên cứu về ảnh hưởng của Diuron tới vật liệu di truyền ADN của các sinh vật thủy sinh. Gần đây Bouilly và cs (2007) đã đánh giá ảnh hưởng của Diuron tới thể dị bội và các yếu tố trong haemocyte của hầu Thái Bình Dương trưởng thành. Tác giả nhận thấy rằng nồng độ 0,3 µg/L Diuron đã có ảnh hưởng bất lợi lớn đến các yếu tố trong haemocyte và đồng thời tăng

mức độ thể dị bội cho hầu. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của Diuron tới vật liệu di truyền ADN cho các loài thủy sinh, đặc biệt là với các loài thuộc nhóm nước mặn. Vì thế, có thể thấy thí nghiệm này là thí nghiệm đầu tiên tiến hành đánh giá ảnh hưởng của Diuron tới ADN trong tế bào phôi hầu. Kết quả cho thấy rằng Diuron ở nồng độ rất thấp trong nước biển (chỉ 0,04 µg/L Diuron) đã bắt đầu

gây ra những biến đổi về ADN trong tế bào phôi hầu ( $p < 0,001$ ).

#### IV. KẾT LUẬN

Các hóa chất bảo vệ thực vật, Atrazine, Alachlor, Diuron và TBT, đã có những ảnh hưởng bất lợi tới giai đoạn hình thành phôi của hầu Thái Bình Dương ở nồng độ rất thấp trong môi trường nước biển. Tính độc của các hóa chất có thể được xếp theo thứ tự giảm dần như sau: Alachlor = TBT > Atrazine > Diuron. Nghiên cứu này cũng chỉ ra khả năng gây tổn thương ADN cho tế bào phôi hầu của Diuron và TBT rất cao ngay ở nồng độ 0,04 µg/L Diuron và 0,01 µg/L TBT trong nước biển.

#### V. ĐỀ XUẤT

Để hiểu rõ hơn về nguyên nhân gây tổn thương ADN của Diuron và TBT cần phải có các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế gây độc các hóa chất thuốc trừ sâu ở mức độ gen và tế bào.

#### LỜI CẢM ƠN

Thí nghiệm được hỗ trợ một phần kinh phí từ dự án ToxicPOPs của Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà nội. Tác giả xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp trong nhóm nghiên cứu sinh thái học độc tố ở phòng thí nghiệm Nước - Môi trường - Hải dương học đã hỗ trợ giúp đỡ trong quá trình bố trí thí nghiệm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### Tiếng Việt

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2010. Danh mục thuốc bảo vệ thực vật được phép sử dụng ở Việt Nam năm 2010. [http://www.agroviet.gov.vn/Pages/news\\_detail.aspx?NewsId=12109&Page=1](http://www.agroviet.gov.vn/Pages/news_detail.aspx?NewsId=12109&Page=1).

##### Tiếng Anh

2. Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfol-Leszkowicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res./ Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 534, 21-32.
3. Anton, F.A., Ariz, M., Alia, M., 1993. Ecotoxic effects of four herbicides (glyphosate, alachlor, chlortoluron and isoproturon) on the algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Sci. Total Environ.* 134, Supplement 2, 845-851.
4. Bellas, J., Beiras, R., Mariño-Balsa, J., Fernández, N., 2005. Toxicity of Organic Compounds to Marine Invertebrate Embryos and Larvae: A Comparison Between the Sea Urchin Embryogenesis Bioassay and Alternative Test Species. *Ecotoxicology* 14, 337-353.
5. Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T., Lapègue, S., 2007. Impact of Diuron on Aneuploidy and Hemocyte Parameters in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 58-63.
6. Comber, S.D.W., 1999. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pestic. Sci.* 55, 696-702.
7. David J, B., 1994. An assessment of the genetic toxicity of atrazine: Relevance to human health and environmental effects. *Mutat. Res./ Rev. Genet. Toxicol.* 317, 133-144.
8. del Carmen Alvarez, M., Fuiman, L.A., 2005. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquat. Toxicol.* 74, 229-241.
9. Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., Chisti, Y., 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Anal. Chim. Acta* 456, 303-312.
10. Fischer-Scherl, T., Veaser, A., Hoffmann, R.W., KÄ¼hnhauser, C., Negele, R.-D., Ewringmann, T., 1991. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 454-461.



11. Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.* 85, 184-191.
12. Hagger, J.A., Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 811-816.
13. Hartgers, E., Aalderink, G.H., Van den Brink, P., Gylstra, R., Wiegman, J., Brock, T., 1998. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquat. Ecol.* 32, 135-152.
14. Hawxby, K., Tubea, B., Ownby, J., Basler, E., 1977. Effects of various classes of herbicides on four species of algae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 203-209.
15. His, E., Heyvang, I., Geffard, O., de Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706-1718.
16. Jha, A.N., Hagger, J.A., Hill, S.J., 2000. Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Mol. Mutag.* 35, 343-350.
17. Joy, V.C., Pramanik, R., Sarkar, K., 2005. Biomonitoring insecticide pollution using non-target soil microarthropods. *J. Environ. Biol.* 26, 571-577.
18. Kang, H.S., Gye, M.C., Kim, M.K., 2005. Effects of Alachlor on Survival and Development of *Bombina orientalis* (Boulenger) Embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 1199-1206.
19. Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1-8.
20. Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663-2670.
21. Manzo, S., Buono, S., Cremisini, C., 2006. Toxic Effects of Irgarol and Diuron on Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Early Development, Fertilization, and Offspring Quality. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 61-68.
22. Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2235-2242.
23. Phyu, Y.L., Warne, M.S.J., Lim, R.P., 2006. Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. *Sci. Total Environ.* 356, 86-99.
24. Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité aqueux: "developpement embryo-larvaire de bivalve". Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 24 pp.
25. Ruiz, J.M., Bryan, G.W., Wigham, G.D., Gibbs, P.E., 1995. Effects of tributyltin (TBT) exposure on the reproduction and embryonic development of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Mar. Environ. Res.* 40, 363-379.
26. Russo, C., Rocco, L., Morescalchi, M.A., Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 168-174.
27. Scahill, J.L., 2008. Effects of atrazine on embryonic development of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and *Xenopus laevis*. *BIOS* 79, 139-149.
28. Takacs, R., Forward, R., Kirby-Smith, W., 1988. Effects of the herbicide alachlor on larval development of the mud crab, *Rhithropanopeus harrisi* (Gould). *Estuaries and Coasts* 11, 79-82.
29. van den Brink, P.J., van Donk, E., Gylstra, R., Crum, S.J.H., Brock, T.C.M., 1995. Effects of chronic low concentrations of the pesticides chlorpyrifos and atrazine in indoor freshwater microcosms. *Chemosphere* 31, 3181-3200.
30. Vryzas, Z., Alexoudis, C., Vassiliou, G., Galanis, K., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 174-181.
31. Yi, X., Ding H, Lu Y, Liu H, Zhang M, W, J., 2007. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 68, 1576-1581.