

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH PHÂN HỦY MẪU ĐỂ XÁC ĐỊNH VI NHỰA TRONG CÁC BỘ PHẬN CỦA CÁ ĐỐI

Trần Thị Ái Mỹ^{1*}, Phan Thị Thuý Hằng², Trần Anh Tuấn³, Lương Quang Đốc², Võ Văn Quý²

¹ Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

² Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³ Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

* Tác giả liên hệ Trần Thị Ái Mỹ <aimy.chem@hueuni.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 06-02-2023; Ngày chấp nhận đăng: 27-03-2023)

Tóm tắt. Nghiên cứu này nhằm nghiên cứu các điều kiện thích hợp để phân hủy các bộ phận khác nhau của cá đối để xác định vi nhựa. Dung dịch KOH 10% được lựa chọn để phân hủy thịt, da và hệ tiêu hóa của cá đối theo các điều kiện tương ứng như sau: tỉ lệ thể tích KOH 10% (mL) và khối lượng phân tích (g) mẫu thịt là 10/1, ủ mẫu ở 25°C trong 72 giờ; mẫu da là 15/1 v/m, ủ mẫu ở 40°C trong 72 giờ; và mẫu hệ tiêu hóa là 20/1, ủ mẫu ở 40°C trong 72 giờ. Hình ảnh phân tích mẫu thực tế cho thấy bằng chứng về sự tồn tại của vi nhựa trong các bộ phận khác nhau của mẫu cá đối khảo sát với các hình dáng và màu sắc khác nhau.

Từ khóa: vi nhựa, thịt, da, hệ tiêu hóa, cá đối

Study on sample decomposition process to determine microplastics in parts of mullet

Tran Thi Ai My^{1*}, Phan Thi Thuy Hang², Tran Anh Tuan³, Luong Quang Doc², Vo Van Quy²

¹ Department of Chemistry, University of Sciences, Hue University

² Department of Biology, University of Sciences, Hue University

³ Department of Environment, University of Sciences, Hue University

* Correspondence to Tran Thi Ai My <aimy.chem@hueuni.edu.vn>
(Received: 06 February 2023; Accepted: 27 March 2023)

Abstract. This study aimed to investigate the suitable conditions for the decomposition of different parts of mullets to determine microplastics in mullet. The 10% KOH solution was selected to decompose the meat, skin, and digestive system of the mullet under the following respective conditions: the ratio of volume 10% KOH (mL) and analytical mass (g) of the meat sample was 10/1, incubate the sample at 25 °C for 72 h; skin sample was 15/1 v/m, incubated at 40 °C for 72 hours; and the digestive system was 20/1, incubated at 40 °C for 72 h. The actual sample analysis image shows evidence of the existence of microplastics in different parts of the surveyed mullet samples with different shapes and colors.

Keywords: microplastics, meat, skin, digestive system, mullet

1 Mở đầu

Hiện nay, vi nhựa (microplastics, viết tắt MPs) được tìm thấy ở khắp nơi trên thế giới [1], từ môi trường nước mặn cho đến trầm tích ở đáy biển sâu [2] hay ở các bãi cát ven biển. Vi nhựa cũng được tìm thấy trong nước ngầm trong các hồ chứa, trong kênh rạch, sông ngòi, hồ của các khu đô thị [3]. Đối với một số loài cá, đã có nhiều nghiên cứu khác nhau chứng minh rằng, nếu đủ thời gian, đủ số lượng tiêu thụ thì các MPs có thể dịch chuyển vào mô của sinh vật [4]. MPs thường bị nhầm lẫn là thức ăn nên được các vi sinh vật biển khác nhau tiêu thụ [5]. Sau khi được tiêu thụ, các MPs có thể thông qua hệ thống tuần hoàn để xâm nhập vào các mô và tế bào khác nhau, do đó có khả năng gây ra một số loại tác dụng phụ (như dẫn đến nguy cơ gây tắt nghẽn hệ thống tiêu hóa, gây chấn thương cơ quan tiêu hóa từ bên trong hoặc/và gây ra cảm giác no giả làm giảm khả năng tiêu thụ thực phẩm khác nên không tạo được năng lượng cho các hoạt động, dẫn đến sinh vật bị mất dinh dưỡng) [5-7]. Nghiên cứu của Turner và cộng sự [8] cũng đã chỉ ra rằng MPs có thể gây hại thông qua quá trình tích lũy sinh học (gây suy giảm miễn dịch tại chỗ) hoặc có thể đóng vai trò là chất vận chuyển cho các hóa chất độc hại khác.

Một số nghiên cứu khác của Campani và cộng sự [9], Lazar và Gracan [10] đã chứng minh rằng việc các sinh vật biển cũng như một số loài sinh vật khác đã có sự tiêu thụ các MPs và việc tiêu thụ này phụ thuộc vào đặc điểm, hành vi của sinh vật cũng như phạm vi của các loại hạt mà sinh vật đó tiếp xúc trong môi trường. Theo Zettler và cộng sự [7], MPs đóng vai trò là nơi định cư quan trọng, chúng như chiếc thuyền chuyên chở các sinh vật di cư từ vùng này sang vùng khác, các sinh vật này phát triển nhanh chóng tạo ra một màng sinh học bao gồm một cộng đồng vi khuẩn đa dạng. Watnick và Kolter [11] ví màng sinh học này như một hệ sinh thái thu nhỏ và màng sinh học này kích thích các sinh vật lớn hơn ăn chúng.

Do vậy, có thể nói các động vật và con người sẽ chịu những ảnh hưởng nhất định khi tiêu thụ thực phẩm có chứa MPs có hoặc không có hấp thụ các độc chất trên chúng. Thậm chí, các loài thủy sản được nuôi cũng có thể hấp thụ MPs vào cơ thể do tiêu thụ bột thức ăn có nhiễm bản MPs [12]. Vì vậy, thông qua chuỗi thức ăn, MPs cùng với những chất độc hấp thụ trên MPs có thể xâm nhập vào các động vật bậc cao hơn và cuối cùng là con người [13-16].

Cá đối là một trong những loại thực phẩm yêu thích của người dân Thừa Thiên Huế nói riêng và miền Trung nói chung. Để định lượng các MPs trong các bộ phận khác nhau của cá đối, cần nghiên cứu phương pháp phân hủy mẫu hiệu quả để không làm ảnh hưởng đến vi nhựa và lựa chọn dung dịch tẩy nổi vi nhựa phù hợp để tách được các vi nhựa ra khỏi nền mẫu sinh học mà không làm phá hủy chúng. Các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau có thể ảnh hưởng đến chất lượng vi nhựa (thay đổi màu vi nhựa ban đầu hay thậm chí phá hủy chúng) và tác động của nhiệt độ ủ cũng ảnh hưởng đến hiệu quả phân hủy mẫu vì ở nhiệt độ cao hơn thì có thể làm tăng tốc độ phân hủy mẫu, nhưng nhiệt độ cao cũng có nguy cơ làm phân hủy các vi nhựa.

Vì vậy, nghiên cứu này với mục đích tìm ra (1) các dung dịch phân hủy mẫu với tỉ lệ thích hợp cùng với nhiệt độ và thời gian ủ mẫu phù hợp để phân hủy các bộ phận khác nhau của mẫu cá đối và (2) dung dịch tẩy nổi các vi nhựa sau quá trình phân hủy mẫu. Từ đó đưa ra quy trình xác định vi nhựa trong mẫu thịt, da và HTH cá đối.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

Các dụng cụ thí nghiệm được rửa sạch bằng xà phòng, rửa siêu âm bằng nước cất hai lần, sấy ở 110°C ít nhất 1 giờ. Riêng các dụng cụ như bình

định mức thì để khô tự nhiên; Các thiết bị đã sử dụng: Kính hiển vi YM0745-L (Biocular Stereo Microscope) có gắn camera 5.0 Megapixel; Bộ lọc hút chân không Rocker 3 nhánh (Đài Loan); Bể chiết siêu âm (Power Sonic 420, Hàn Quốc); Máy xay cầm tay (Philip, Nhật); Cân phân tích có độ chính xác 0,0001 g (Hansung, Trung Quốc); Tủ sấy (OF-02, Hàn Quốc); Các chất rắn, KOH khan, NaI, NaCl, KCl và các axit đậm đặc HNO₃, HCl, H₂O₂ đều là loại tinh khiết phân tích (Merck, Đức).

2.2 Chuẩn bị mẫu

Mẫu cá đối (*Mugil cephalus*) được lấy vào tháng 6/2022 tại đầm Cầu Hai, tỉnh Thừa Thiên Huế. Mẫu được gói trong giấy nhôm và bảo quản lạnh trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm. Các mẫu cá đối sau khi mang về phòng thí nghiệm được tiến hành cân và đo kích thước từng con gồm chiều dài (kí hiệu là D cm), chiều rộng (kí hiệu là R cm) và khối lượng. Mẫu cá đối được làm sạch, loại bỏ xương và chia thành các bộ phận để phân tích bao gồm: da, hệ tiêu hóa và thịt cá. Việc mổ xẻ cá được thực hiện theo Luther và cộng sự, 2016 [17]. Mỗi con cá được đặt trên một khay kim loại và được mổ xẻ từ thực quản đến hậu môn của cá [17-18]. Hệ tiêu hóa (HTH), phần da cá, phần thịt cá được tách riêng, cân và đặt vào đĩa Petri và đậy nắp ngay để thực hiện quá trình phân hủy mẫu tiếp theo.

2.3 Phương pháp phân tích

Phương pháp phân hủy mẫu để không ảnh hưởng đến các vi nhựa

Việc nghiên cứu tài liệu tham khảo và dựa trên các kết quả của một số nghiên cứu đã thực hiện trước đây [19-21], các dung dịch phân hủy mẫu được lựa chọn để khảo sát là: KOH (10% w/v), HNO₃ 10%, HNO₃ 20%, HCl 20%, HCl 37% và H₂O₂ 30%. Các vi nhựa chuẩn 0,1 g mỗi loại: polypropylene (PP), polyethylene (PE), polyethyleneterephthalate (PET), polyamide (PA), polycarbonate (PC) được thêm vào mỗi 60 mL

dung dịch phân hủy mẫu KOH (10% w/v), HNO₃ 10%, HNO₃ 20%, HCl 20%, HCl 37%, và H₂O₂ 30% đựng trong bình tam giác thủy tinh 125 mL, đậy kín bằng giấy bạc. Các bình được đặt ở nhiệt độ phòng 25 °C. Sau thời gian 96 giờ, mẫu được lọc qua giấy lọc Whatman 1821-047 (đường kính 47 mm, kích thước lỗ lọc 1,0 μm) bằng hệ thống hút chân không. Trước và sau khi lọc, giấy lọc được cân trên cân phân tích với độ chính xác 0,1 mg. Để kiểm tra sự thay đổi khối lượng (nếu có) của giấy lọc do quá trình xử lý hóa học, các giấy lọc là mẫu trắng được tiến hành song song.

Xác định hệ số thu hồi Rev (%) theo công thức sau:

$$Rev (\%) = \frac{m_a - m_0 - m_{blank}}{m_{spiked\ MPs}} \cdot 100$$

trong đó: $m_{spiked\ MPs}$ là tổng khối lượng các vi nhựa đã được thêm; m_a và m_0 là khối lượng giấy lọc sau và trước khi lọc; m_{blank} là khối lượng của các phần hóa chất còn lại trên giấy lọc của mẫu trắng, được tính bằng khối lượng giấy lọc chứa mẫu trắng sau quá trình xử lý hóa chất, trừ đi khối lượng giấy lọc trước quá trình xử lý hóa chất.

Phương pháp phân hủy các bộ phận mẫu cá đối

Với các dung dịch phân hủy mẫu cho kết quả hệ số thu hồi cao Rev% từ 95 đến 105%, và các vi nhựa trong bình phân hủy mẫu không bị biến dạng hoặc thay đổi màu sắc, thì các dung dịch phân hủy này được lựa chọn để tiếp tục khảo sát hiệu quả phân hủy các bộ phận khác nhau của cá đối (da, hệ tiêu hóa và thịt). Các bình chứa khối lượng mẫu (da, hệ tiêu hóa và thịt) cá đối cần phân tích, được thêm thể tích thích hợp các dung dịch phân hủy mẫu đã được chọn như mô tả ở mục 2.3, đặt ở nhiệt độ phòng 25°C hoặc trong tủ sấy ở 40°C và thực hiện quá trình quan sát bằng mắt ở các thời gian 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ.

Hiệu quả của quá trình phân hủy mẫu H (%) được đánh giá thông qua việc xác định hàm lượng sinh vật chưa bị phân hủy hoặc còn lại rất ít (nhỏ

hơn 5%) giữ lại trên giấy lọc (nếu có) theo công thức sau:

$$H (\%) = \frac{m_s - (m_a - m_0 - m_{blank})}{m_s} \cdot 100$$

trong đó: m_s là khối lượng mẫu sinh vật đem phân hủy; m_a , m_0 và m_{blank} là được định nghĩa như mục 2.3.

Phương pháp tuyển nổi vi nhựa ra khỏi dịch chiết mẫu sau quá trình phân hủy

Sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) là một loại muối có khối lượng riêng rất lớn ($d = 4,18 \text{ g/cm}^3$), NaI cũng là một loại muối có khối lượng riêng khá lớn ($d = 3,67 \text{ g/cm}^3$) cho hiệu quả tuyển nổi hầu hết các vi nhựa bao gồm các vi nhựa có khối lượng riêng lớn như PET ($d = 1,32 - 1,41 \text{ g/cm}^3$) và PVC ($d = 1,14 - 1,56 \text{ g/cm}^3$). Tuy nhiên, giá thành $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ cũng như NaI là quá đắt, do đó việc khảo sát các dung dịch có giá thành thấp hơn như NaCl ($d = 2,16 \text{ g/cm}^3$), KCl ($d = 1,98 \text{ g/cm}^3$) để lựa chọn dung dịch tuyển nổi vi nhựa phù hợp nhằm tiết kiệm chi phí phân tích là cần thiết. Mẫu được phân hủy bằng dung dịch phân hủy mẫu đã được lựa chọn sau các quá trình thí nghiệm, được thêm 15 mL dung dịch tuyển nổi khác nhau Na_2WO_4 bão hòa/NaI bão hòa/NaCl bão hòa/KCl bão hòa/ ZnCl_2 bão hòa vào từng bình thí nghiệm, lắc 30 phút và để lắng 60 phút. Lọc phần nổi ở trên qua phễu lọc bằng bộ hút chân không, phần cặn còn lại tiếp tục hòa tan với dung dịch tuyển nổi, tiếp tục tuyển phần nổi qua giấy lọc, lặp lại quá trình này 3 lần để đảm bảo hiệu quả của quá trình tuyển nổi vi nhựa trên giấy lọc. Kiểm tra độ đúng của quá trình tuyển nổi vi nhựa thông qua xác định độ thu hồi của các vi nhựa chuẩn tương tự như mục 2.3.

Mẫu trắng (mẫu không có nền mẫu sinh vật) được thực hiện đồng thời để khắc phục khả năng nhiễm bẩn quy trình phân tích. Để tránh nhiễm bẩn, tất cả dung dịch phân tích (bao gồm nước cất hai lần sử dụng, dung dịch phân hủy mẫu động vật thủy sinh và dung dịch tuyển nổi vi nhựa) được lọc

bằng giấy lọc 4,7 mm ($d = 1,0 \mu\text{m}$) trước khi sử dụng. Tất cả các vật chứa và cốc được tráng ba lần bằng nước siêu sạch (MiliQ water).

Để tránh mẫu có thể bị nhiễm sợi tổng hợp trong không khí, quá trình mô phỏng tiêu hóa, và tách các bộ phận của cá đối được tiến hành nhanh chóng và mẫu được đặt trong đĩa Petri và đậy nắp ngay lập tức để tránh khả năng nhiễm bẩn bởi sợi trong không khí. Găng tay cao su, dụng cụ bằng thủy tinh và kim loại, và áo phòng thí nghiệm bằng vải cotton luôn được sử dụng.

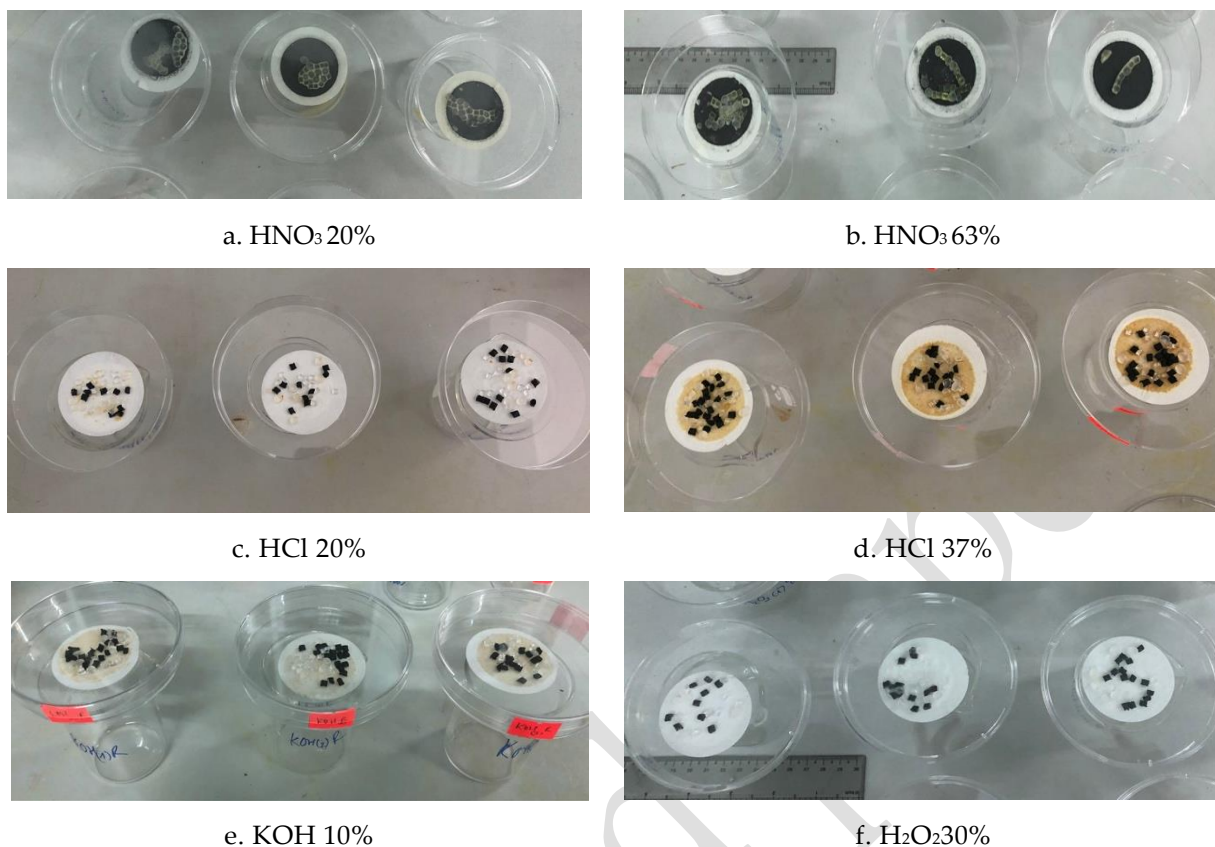
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khảo sát các điều kiện thích hợp để phân hủy mẫu cá đối

Ảnh hưởng của các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau đến các vi nhựa tiêu chuẩn

Hình 1. chỉ ra các hình ảnh phân hủy các mẫu nhựa chuẩn với các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau như đã mô tả ở mục 2.3.

Quan sát bằng mắt thường ở Hình 1.a và 1.b cho thấy, sự phân hủy mẫu chuẩn vi nhựa bằng dung dịch HNO_3 ở bất kỳ nồng độ nào đều làm chảy hoàn toàn nhựa chuẩn polyamide (nylon 6,6) (màu đen) và biến dạng nhựa poly propylen (PP) (màu trắng); đối với các chất nhựa chuẩn còn lại như PE và PC dạng bột mịn nên không quan sát được sự biến dạng bằng mắt thường. Điều tương tự cũng đã được báo cáo bởi Claessens và cs [22] khi đã chứng minh hạt polystyrene (PS) bị tan chảy khi tiếp xúc trực tiếp với axit nitric. Ngoài ra, Hình 1.d cũng cho thấy nền giấy lọc có màu vàng đậm làm cản trở quá trình quan sát vi nhựa trên giấy lọc. Đồng thời, việc tính toán độ thu hồi các mẫu chuẩn sau khi phân hủy bằng HCl 37% cho kết quả nhỏ hơn 95% có thể chứng tỏ HCl đậm đặc có thể phân hủy một số vi nhựa chuẩn ngay tại nhiệt độ phòng nên dung dịch HCl 37% không được lựa chọn để khảo sát tiếp.



Hình 1. Các mẫu nhựa chuẩn được phân hủy với các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau.

Kết quả tính toán độ thu hồi hàm lượng nhựa chuẩn được phân hủy bởi các dung dịch phân hủy mẫu còn lại là từ 94% đến 105%. Do đó, những dung dịch phân hủy mẫu như HCl 20%, KOH 10% và H₂O₂ 30% có thể xem xét để tiến hành khảo sát hiệu quả phân hủy các bộ phận da, hệ tiêu hóa và thịt của mẫu cá đối cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau ở các nhiệt độ khác nhau đến sự phân hủy các bộ phận khác nhau của mẫu cá đối

Để lựa chọn điều kiện phân hủy mẫu thích hợp với từng bộ phận của cá đối, các dung dịch phân hủy mẫu như: HCl 20%, KOH 10% và H₂O₂ 30% với các tỉ lệ thể tích khác nhau được thêm vào các mẫu phân tích khác nhau (xem bảng 1). Các bình phân hủy mẫu được đặt ở nhiệt độ phòng (25 °C) và trong tủ sấy (40 °C), được quan sát ở các

thời gian cố định là 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ. Mỗi thí nghiệm làm lặp lại 3 lần.

Quá trình quan sát bằng mắt thường cho thấy, ngay sau khi cho dung dịch phân hủy mẫu là H₂O₂ 30% với tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) là 10/1 vào các mẫu thịt cá đối, thì đều xảy ra hiện tượng sủi bọt và trào dung dịch mẫu ra ngoài. Do đó, chúng tôi giảm tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) xuống 6/1, tuy nhiên, vẫn tiếp tục xảy ra hiện tượng sủi bọt và trào dung dịch mẫu ra ngoài sau khoảng 15 phút thêm dung dịch phân hủy mẫu H₂O₂ 30%. Đối với các mẫu da và thịt cá đối, thì cũng xảy ra hiện tượng sủi bọt và trào dung dịch mẫu ra ngoài sau khoảng 1 – 2 giờ thêm dung dịch phân hủy mẫu H₂O₂ 30% với tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) là 10/1 và 6/1. Do đó, dung dịch H₂O₂ 30% không được lựa chọn cho những khảo sát tiếp theo vì khó đảm bảo tính toàn vẹn của mẫu phân tích.

Bảng 1. Các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau với tỉ lệ thể tích và khối lượng mẫu khác nhau được thêm vào các bộ phận khác nhau của cá đối, mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C và ở nhiệt độ 40 °C

Dung dịch phân hủy mẫu V (mL)/m _{mẫu} (g) ^(a)	Hệ tiêu hóa				Da				Thịt				
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	
Mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng 25 °C													
KOH 10% tỉ lệ 10/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	K
KOH 10% tỉ lệ 15/1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	K
KOH 10% tỉ lệ 20/1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	K
HCL 20% tỉ lệ 10/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCL 20% tỉ lệ 20/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂ 10% tỉ lệ 10/1	-	K	K	K	-	K	K	K	-	K	K	K	K
H ₂ O ₂ 10% tỉ lệ 6/1	-	K	K	K	-	K	K	K	-	K	K	K	K
Mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng 40 °C													
KOH 10% tỉ lệ 10/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	K
KOH 10% tỉ lệ 15/1	-	-	-	K	-	-	+	K	-	-	-	+	K
KOH 10% tỉ lệ 20/1	-	-	+	K	-	-	+	K	-	-	-	+	K
HCL 20% tỉ lệ 10/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCL 20% tỉ lệ 20/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Điều kiện thí nghiệm: ^(a)Tỉ lệ thể tích(mL) dung dịch phân hủy mẫu với khối lượng mẫu phân tích (g); các ký hiệu: “-” vẫn còn nền mẫu sinh học; “+” gần như không còn nền mẫu sinh học; “K” không quan sát

Kết quả quan sát mẫu phân hủy sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ đối với các bình ở nhiệt độ phòng và nhiệt độ 40 °C (trong tủ sấy) cho thấy, các mẫu được phân hủy bằng HCl 20% với tỉ lệ

thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) là 10/1 và 20/1 đều không phân hủy tốt các mô. Hình 2 là một số hình ảnh phân hủy các bộ phận của mẫu cá đối bằng HCl 20% tỉ lệ 10/1 sau 96 giờ ở nhiệt độ phòng (25°C).



Mẫu phân hủy thịt cá đối

Mẫu phân hủy da cá đối

Mẫu phân hủy hệ tiêu hóa cá đối

Hình 2. Hình ảnh phân hủy các bộ phận mẫu cá đối bằng dung dịch HCl 20% tỉ lệ 10/1 ở nhiệt độ phòng sau 96 giờ

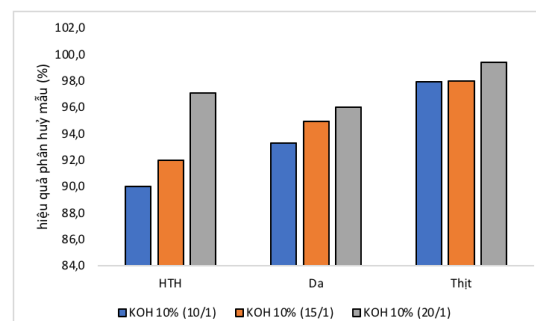
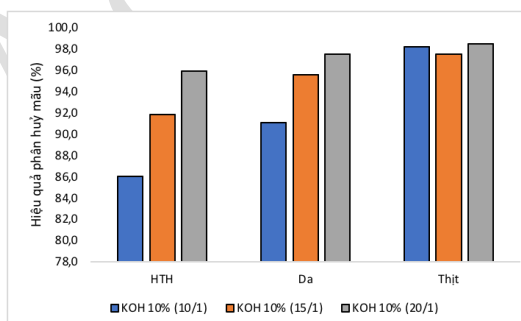
Các bộ phận của cá đối sau khi phân hủy bằng các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau như HCl 20% với tỉ lệ thể tích/khối lượng mẫu là 10/1 và 20/1, hoặc KOH 10% với tỉ lệ thể tích/khối lượng mẫu là 10/1, 15/1 và 20/1 ở nhiệt độ phòng và 40 °C được tiến hành xác định hiệu quả phân hủy mẫu như mục 2.3 và kết quả được trình bày ở Bảng 2 và Hình 3.

Kết quả ở bảng 3 chỉ ra rằng, hiệu quả phân hủy nền mẫu hệ tiêu hóa, da và thịt cá đối bằng HCl 20% trong vòng 96 giờ ở tỉ lệ dung dịch phân hủy mẫu với khối lượng mẫu phân tích (g) là 10/1 và 20/1 đều không đạt tối ưu ($H < 95\%$) và do đó, dung dịch HCl 20% không phải là tác nhân phù hợp để phân hủy các bộ phận mẫu cá đối. Điều này phù hợp với báo cáo của Nuelle và cộng sự [23] khi cho rằng HCl 20% không có khả năng phân hủy vật liệu hữu cơ trong nền mẫu sinh học.

Bảng 2. Hiệu quả phân hủy các bộ phận khác nhau của cá đối bằng các dung dịch phân hủy mẫu khác nhau với tỉ lệ thể tích khác nhau

Dung dịch phân hủy mẫu	Hiệu quả phân hủy mẫu (%) ở nhiệt độ phòng (n=3)			Hiệu quả phân hủy mẫu (%) ở 40°C (n=3)			
	V (mL)/m _{mẫu} (g) ^(a)	HTH ^(b)	Da ^(b)	Thịt ^(c)	HTH ^(c)	Da ^(c)	Thịt ^(c)
KOH 10% (10/1)		86,0± 4,6	91,1± 3,7	98,2± 0,7	90,0±2,5	93,3±5,0	97,9±1,2
KOH 10% (15/1)		91,8± 2,3	95,6± 0,8	97,5± 1,3	92,0±3,2	94,9±1,8	98,0±4,1
KOH 10% (20/1)		95,9± 1,4	97,5± 0,2	98,5± 0,1	97,1±3,4	96,0±2,8	99,4±2,3
Dung dịch phân hủy mẫu	Hiệu quả phân hủy mẫu (%) ở nhiệt độ phòng (n=3)			Hiệu quả phân hủy mẫu (%) ở 40 °C (n=3)			
	V (mL)/m _{mẫu} (g) ^(a)	HTH ^(b)	Da ^(b)	Thịt ^(b)	HTH ^(b)	Da ^(b)	Thịt ^(b)
HCl 20% (10/1)		72,5±5,3	64,2±8,1	75,0±3,4	74,5±8,6	70,8±4,8	69,0±3,4
HCl 20% (20/1)		78,0±7,0	71,5± ,5	72,9±3,9	84,9±2,4	79,4±2,5	71,1±6,7

(*) Điều kiện thí nghiệm: ^(a)Tỉ lệ thể tích(mL) dung dịch phân hủy mẫu với khối lượng mẫu phân tích (g); khối lượng da và hệ tiêu hóa đều nhỏ hơn 3,000 g; khối lượng thịt cá được cân chính xác là 6,000 g. Thời gian ủ mẫu là ^(b)96 giờ, ^(c)72 giờ.



a) ĐKTN: ở nhiệt độ phòng (25 °C); sau 72 giờ với mẫu thịt và sau 96 giờ với mẫu HTH và da

b) ở nhiệt độ 40 °C; sau 72 giờ với mẫu thịt, HTH và da

Hình 3. Hiệu quả phân hủy các bộ phận khác nhau của cá đối bằng dung dịch phân hủy KOH 10% với các tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) khác nhau

Kết quả ở Bảng 2 và Hình 3 cho thấy dung dịch KOH 10% ở tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) là 10/1 chi loại bỏ tốt các mô trong mẫu thịt cá đối tốt ($H > 95\%$) sau 72 giờ ở nhiệt độ phòng và sau 72 giờ ở nhiệt độ 40 °C, chứ không loại bỏ được các mô trong nền mẫu da và nền mẫu hệ tiêu hóa của cá đối ở nhiệt độ phòng và ở nhiệt độ 40 °C sau 96 giờ. Tuy nhiên, khi tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) là 15/1 thì dung dịch KOH 10% tăng hiệu quả loại bỏ các mô hơn đối với hệ tiêu hóa và da, nhưng chỉ thực sự đạt hiệu quả phân hủy mẫu mong muốn với mẫu da cá đối ($H > 95\%$) sau 96 giờ ở nhiệt độ phòng và sau 72 giờ ở nhiệt độ 40°C. Đối với hệ tiêu hóa cá đối, thì tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g) là 20/1 thì lượng dung dịch KOH 10% mới đủ để loại bỏ các mô, và hiệu quả phân hủy mẫu đạt lớn hơn 95% sau 96 giờ ở nhiệt độ phòng và sau 72 giờ ở nhiệt độ 40°C.

Kiểm tra t-test với số liệu ở Bảng 2 cho thấy, kết quả cùng một loại mẫu thịt cá đối, cùng thời gian phân hủy mẫu là 72 giờ, thì hiệu quả phân hủy mẫu ở nhiệt độ phòng và nhiệt độ ủ sấy (40°C) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (các giá trị p đều lớn hơn 0,05). Do đó, nhiệt độ phòng được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Đối với mẫu da và hệ tiêu hóa thì khi có quá trình gia nhiệt lên 40°C trong tủ sấy, thời gian phân hủy mẫu có rút ngắn lại 24 giờ (xem Bảng 3, Hình 3 và Hình 4). Như vậy, để rút ngắn thời gian phân tích, đối với mẫu da và mẫu thịt cá đối, chúng tôi lựa chọn điều kiện phân hủy mẫu trong tủ sấy (40°C). Các điều kiện phân hủy mẫu hệ tiêu hóa, da và thịt cá đối được tóm tắt ở bảng 4.

Bảng 3. Điều kiện phân hủy các bộ phận mẫu cá đối bằng dung dịch KOH 10%

Nền mẫu	HTH	Da	Thịt
Tỉ lệ thể tích (mL)/khối lượng mẫu (g)	20/1	15/1	10/1
Thời gian	72 giờ	72 giờ	72 giờ
Nhiệt độ	40 °C	40 °C	25 °C

3.2 Khảo sát ảnh hưởng của dung dịch tẩy nổi các vi nhựa sau quá trình phân hủy mẫu.

Quá trình thí nghiệm được mô tả như mục 2.3. và kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các dung dịch khác nhau đến khả năng tẩy nổi vi nhựa ra khỏi dịch chiết các bộ phận mẫu cá đối

Dung dịch tẩy nổi vi nhựa	Rev (%) ± SD (n = 3)		
	HTH	Da	Thịt
Na ₂ WO ₄ bão hòa	98,0±2,1	99,5± 3,2	98,8±2,6
NaI bão hòa	97,4±1,3	98,7± 3,4	99,3±4,8
NaCl bão hòa	94,2± 4,1	94,9± 4,3	95,5± 5,1
KCl bão hòa	93,5± 3,0	94,3± 1,5	93,8± 4,9
ZnCl ₂ bão hòa	94,8 ± 2,7	93,6 ± 2,3	94,5 ± 3,4

(*Điều kiện thí nghiệm: như bảng 3)

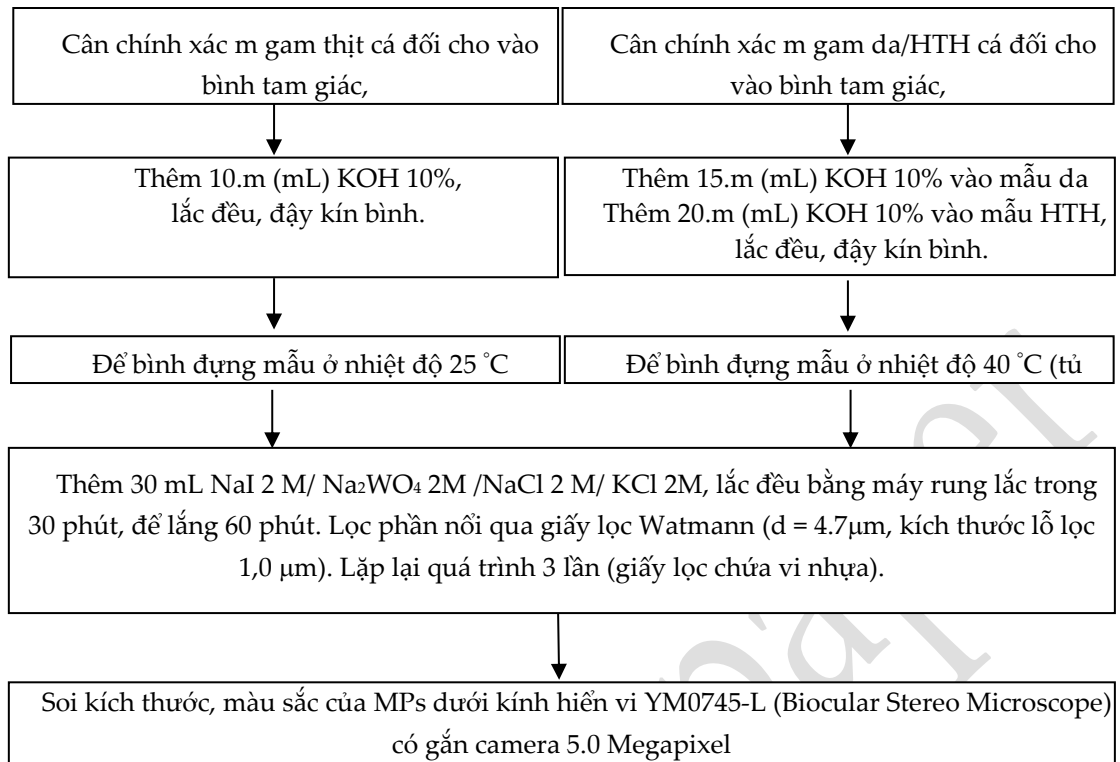
Các dung dịch tẩy nổi vi nhựa Na₂WO₄ bão hòa, NaI bão hòa đều cho kết quả độ thu hồi lớn hơn 95%. Các dung dịch như KCl bão hòa, NaCl bão hòa và ZnCl₂ cho kết quả độ thu hồi xấp xỉ 95% nên nếu muốn tiết kiệm chi phí thì có thể lựa chọn chúng để tẩy nổi vi nhựa khỏi dịch chiết các bộ phận thịt, da, hệ tiêu hóa mẫu cá đối sau khi phân hủy mẫu bằng dung dịch KOH 10% ở các điều kiện thích hợp như bảng 3.

3.3 Quy trình phân tích vi nhựa trong các bộ phận khác nhau của cá đối

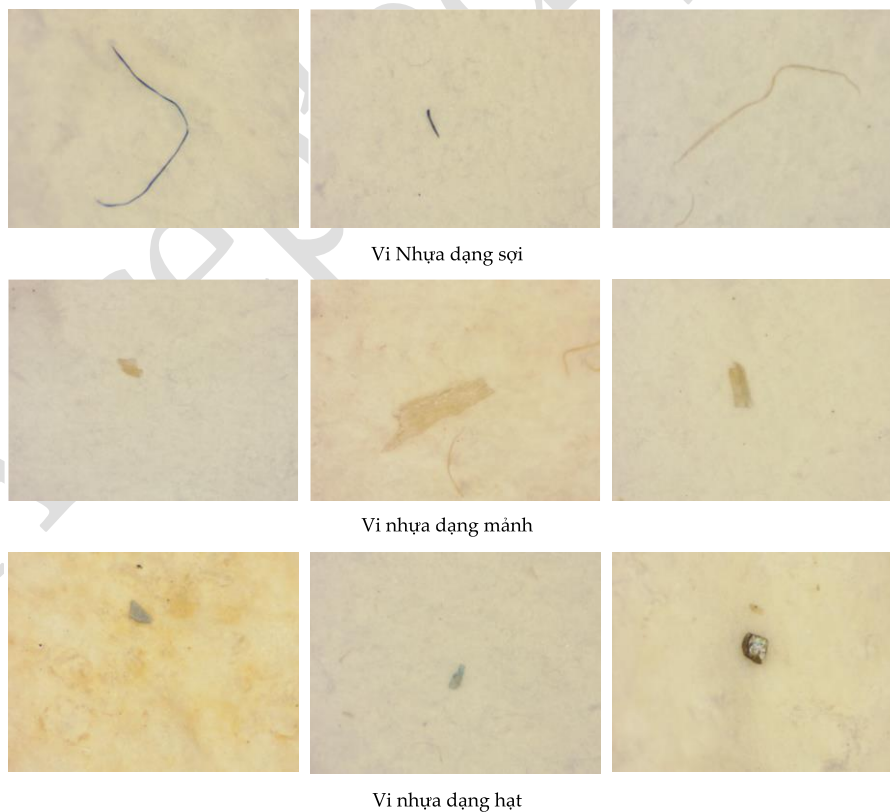
Trên cơ sở các kết quả thu được, quy trình phân tích vi nhựa trong các bộ phận mẫu cá đối được đề xuất ở Hình 4.

3.4 Một số ảnh chụp vi nhựa trong các bộ phận của cá đối

Áp dụng quy trình phân tích ở Hình 4 cho mẫu thịt, da và hệ tiêu hóa cá đối, thu được một số hình ảnh vi nhựa như ở Hình 5. Hình ảnh phân tích mẫu thực tế cho thấy bằng chứng về sự tồn tại của vi nhựa trong các bộ phận khác nhau của mẫu cá đối khảo sát với các hình dáng và màu sắc khác nhau.



Hình 4. Quy trình phân tích vi nhựa trong thịt, da và hệ tiêu hóa cá đối



Hình 5. Một số ảnh chụp vi nhựa trong các mẫu nghiên cứu

4 Kết luận

Phương pháp phân hủy các bộ phận của cá đối được thực hiện trong dung dịch KOH 10% theo tỉ lệ phản ứng tương ứng 10/1 v/m (10 mL KOH 10% tương đương với 1,0 g mẫu thịt cá), ở 25 °C trong 72 giờ và 15/1 v/m (15 mL KOH 10% tương đương với 1,0 g mẫu da cá), ở 40 °C trong 72 giờ; và 20/1 v/m (20 mL KOH 10% tương đương với 1,0 g mẫu thệ tiêu hóa), ở 40 °C trong 72 giờ đã được lựa chọn. Phương pháp này có thể áp dụng để phân tích thành công hàm lượng các vi nhựa trong các bộ phận khác nhau của mẫu cá đối. Hình ảnh phân tích mẫu thực tế cho thấy vi nhựa bằng chứng về sự tồn tại của vi nhựa trong các bộ phận mẫu cá đối khảo sát với nhiều loại vi nhựa khác nhau về hình dáng và màu sắc. Do đó, mở rộng nghiên cứu sâu hơn về đối tượng nghiên cứu, cấu trúc vi nhựa và dự đoán nguồn gốc của chúng là rất cần thiết để kịp thời có những giải pháp khuyến cáo thích hợp.

Lời cảm tạ

Đây là kết quả của đề tài khoa học và công nghệ cấp tỉnh được ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên Huế đầu tư (THH.2021-KC.04).

Tài liệu tham khảo

1. Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 2011;62(12):2588-2597.
2. da Costa JP, Santos PS, Duarte AC, Rocha-Santos T. (Nano) plastics in the environment—sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*. 2016;566:15-26.
3. Rose D, Webber M. Characterization of microplastics in the surface waters of Kingston Harbour. *Science of the Total Environment*. 2019;664:753-760.
4. Compá C, Ventero A, Iglesias M, Deudero S. Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;128:89-96.
5. De Sá LC, Luís LG, Guilhermino L. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution*. 2015;196:359-362.
6. Foley CJ, Feiner ZS, Malinich TD, Höök TO. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of the Total Environment*. 2018; 550-559.
7. Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler L. A Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science & Technology*. 2013;47(13):7137 – 7146.
8. Turner A, Wallerstein C, Arnold R. Identification, origin and characteristics of bio-bead microplastics from beaches in western Europe. *Science of the Total Environment*. 2019;664:938-947.
9. Campani T, Bainsi M, Giannetti M, Cancelli F, Mancusi C, Serena F, Fossi MC. Presence of plastic debris in loggerhead turtle stranded along the Tuscany coasts of the Pelagos Sanctuary for Mediterranean Marine Mammals (Italy). *Marine Pollution Bulletin*. 2013;74(1):225-230.
10. Lazar B, Gracan R. Ingestion of marine debris by loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 2011;62(1):43-47.
11. Watnick, P, Kolter R. Biofilm city of microbes. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(10):2675-2679.
12. Renzi M, Guerranti C, Blašković A. Microplastic contents from maricultured and natural mussels. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;131:248-251.
13. Farrell P, Nelson K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L) to *Carcinus maenas* (L). *Environmental Pollution*. 2013;177:1-3.
14. Hartmann NB, Rist S, Bodin J, Jensen LHS, Schmidt SN, Mayer P, Meibon A, Baun A. Microplastics as vectors for environmental contaminants: exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2017;13:488-493.
15. Santana MFM, Moreira FT, Turra A. Trophic transference of microplastics under a low exposure scenario: insights on the likelihood of particle cascading along marine food-webs. *Marine Pollution Bulletin*. 2017;121:154-159.

16. Teuten EL, Saquing JM, Knappe DR, Barlaz MA, Jonsson S, Björn A, Takada H. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009;364(1526):2027-2045.
17. Lusher AL, O'Donnell C, Officer R, O'Connor I. Microplastic interactions with North Atlantic mesopelagic fish. *ICES Journal of Marine Science*. 2016;73(4):1214-1225.
18. Su L, Deng H, Li B, Chen Q, Pettigrove V, Wu C, Shi H. The occurrence of microplastic in specific organs in commercially caught fishes from coast and estuary area of east China. *Journal of Hazardous Materials*. 2019;365:716-724.
19. Avio CG, Gorbi S, Regoli F. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*. 2015;111:18–26.
20. Karami A, Golieskardi A, Choo C K, Romano N, Ho YB, Salamatinia B. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment*. 2016;578:485-644.
21. Tran Thi Ai My, Nguyen Duy Dat, Hoang Thai Long, Tran Thuc Binh Occurrence of microdebris in muscle of round scad (*Decapterusmaruadsi*) collected from Central Vietnam. *EnviromentAsia*. 2022;15(3):38-47.
22. Claessens, M, Van Cauwenberghe, L, Vandegehuchte, MB, Janssen, CR New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms *Marine Pollution Bulletin*. 2013;70:227-233.
23. Nuelle MT, Dekiff J H, Remy D, Fries E. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*. 2014;184:161-169.