

ƯỚC TÍNH GIÁ TRỊ EC₅₀ TRONG THỬ NGHIỆM ĐỘC CẤP TÍNH THÔNG QUA MỘT SỐ PHẦN MỀM THỐNG KÊ

NGUYỄN XUÂN TÔNG

Viện Khoa học Công nghệ và Quản lý Môi trường, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh
nguyenuxuantong@iuh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v62i02.4782>

Tóm tắt. Thử nghiệm đánh giá độc tính của hóa chất trên các loài giáp xác là mô hình được sử dụng phổ biến để ước tính nồng độ ảnh hưởng 50% (EC₅₀) nhằm xác định những rủi ro tiềm ẩn đối với hệ thống thủy sinh. Mục tiêu của nghiên cứu là áp dụng các phần mềm thống kê trong ước tính giá trị EC₅₀ đối với kết quả độc tính mô hình phòng thí nghiệm. Trong nghiên cứu hiện tại, giá trị EC₅₀ của hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT) khi phơi nhiễm cấp tính (24 giờ) lên *Moina macrocopa* (*M. macrocopa*) được ước tính bằng đường cong liều – đáp ứng và bốn phần mềm thống kê như JMP Pro 16, Origin Pro 8.5.1, Sigmaplot 14.0, IBM SPSS 20. Kết quả ước tính giá trị EC₅₀ khi áp dụng đường cong liều – đáp ứng là 25,06 (µg/L), đối với các phần mềm thống kê lần lượt là 13,48; 22,41; 25,70 và 22,55 (µg/L). Giá trị EC₅₀ về cơ bản có sự chênh lệch giữa các phương pháp thống kê với khác biệt lớn nhất là phần mềm JMP Pro 16 (~10 µg/L). Phương trình thiết lập và hình thức phân bố dữ liệu của từng phần mềm khác nhau dẫn đến các giá trị EC₅₀ (sai số chuẩn (SE) = 2,19 µg/L) đối với dữ liệu độc tính khác nhau. Tất cả các phần mềm thống kê đều thu được giá trị EC₅₀, nhưng phân tích JMP Pro 16 đã chỉ ra hiệu suất tốt nhất do khả năng trích xuất các chỉ số chưa được thiết lập trong phương trình của mô hình hồi quy.

Từ khóa. Ước tính EC₅₀, độc tính, phần mềm thống kê.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) là thành phần quan trọng trong giải quyết các khủng hoảng về lương thực và đảm bảo an toàn sản xuất thực phẩm [1]. Tuy nhiên, hầu hết các loại HCBVTV đều tiếp xúc với môi trường và liên tục lắng đọng trong nước (ví dụ như Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT)) [2]. Độc tính của HCBVTV với hệ sinh thái thủy sinh là vấn đề then chốt đối với sự an toàn môi trường, trong đó sinh vật thủy sinh là loài dễ bị tổn thương nhất [3, 4]. Điển hình là *Moina macrocopa* (*M. macrocopa*) – một loài giáp xác được tìm thấy rộng rãi trong các thủy vực trên toàn cầu [5]. *M. macrocopa* có thể được sử dụng như một dạng động vật phù du đại diện cho hệ sinh thái trong các thử nghiệm độc tính [6, 7].

Những thử nghiệm độc tính phòng thí nghiệm được sử dụng để ước tính nồng độ độc chất ảnh hưởng đến sinh vật sống. Độc tính có thể được biểu thị bằng giá trị tính toán nồng độ ảnh hưởng (EC_x) thông qua các phương pháp thống kê khác nhau phù hợp với biểu thức số học tại điểm cuối đánh giá của thử nghiệm (sự tử vong). Phản ứng của sinh vật đối với độc chất có thể được định lượng và tồn tại các quy trình thống kê khác nhau để xác định mối quan hệ liều – đáp ứng đối với dạng phản ứng này.

Phương pháp xác định nồng độ ảnh hưởng 50% (EC₅₀) cơ bản nhất trong đánh giá độc tính là tính toán dựa trên đường cong liều – đáp ứng. Tuy nhiên, với thời đại công nghệ 4.0 thì việc sử dụng các phần mềm thống kê nhằm đơn giản hóa quá trình xử lý dữ liệu là phương pháp nhanh chóng và dễ dàng nhất, như phần mềm JMP, Origin, Sigmaplot, IBM SPSS, ... Điển hình như trong các mẫu thử nghiệm của Li và cộng sự [8], giá trị EC₅₀ đối với nấm đã được ước tính bằng cách sử dụng các phần mềm thống kê như IBM SPSS, GraphPad Prism, DPS và phương pháp log tuyến tính. Tuy nhiên, thực tế cho thấy nội dung nghiên cứu này vẫn còn nhiều hạn chế, chưa được quan tâm cả trong nước lẫn quốc tế. Cụ thể, ở Việt Nam vẫn chưa có báo cáo về ứng dụng các phần mềm thống kê như JMP, Origin, Sigmaplot, IBM SPSS, ... để ước tính EC₅₀ trong thử nghiệm độc tính. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu nhằm áp dụng bốn phần mềm thống kê hiện đại để ước tính giá trị EC₅₀ trong thử nghiệm độc cấp tính phòng thí nghiệm, đây cũng chính là điểm mới và đóng góp quan trọng của nghiên cứu so với các công bố trước đây.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thử nghiệm độc tính

M. macrocopa được thu thập từ Trung Tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh và nuôi cấy trong môi trường nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chu kỳ sáng: tối là 16 giờ: 8 giờ, nồng độ oxy hòa tan trong môi trường từ 5 – 7 mg/L và pH là 7 – 8. *M. macrocopa* dưới 24 giờ tuổi được thu thập sử dụng cho thử nghiệm đánh giá độc tính.

Hóa chất DDT cấp thương mại là sản phẩm của Đức (độ tinh khiết 98%). Việc sử dụng cấp thương mại mô phỏng ứng dụng thực địa của HCBVTV. Dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L được chuẩn bị trong nước cất 3 lần.

Tất cả dữ liệu về độc cấp tính được xác định bằng cách cho 09 cá thể *M. macrocopa* dưới 24 giờ tuổi phơi nhiễm với 50 mL DDT ở các nồng độ khác nhau (5, 10, 24, 30 và 35 $\mu\text{g/L}$) theo quy trình thử nghiệm độc cấp tính (24 giờ), mỗi nồng độ thử nghiệm gồm 4 lần lặp với tổng 36 cá thể. Ngoài ra, thiết lập các lô đối chứng (không bổ sung hóa chất) để xác nhận tính chính xác của thử nghiệm [9]. *M. macrocopa* không được cho ăn trong 24 giờ thử nghiệm đánh giá độc tính.

Sự tử vong của *M. macrocopa* được sử dụng làm điểm cuối đánh giá và ghi nhận giá trị sau 24 giờ phơi nhiễm. Tỷ lệ tử vong được định nghĩa là không quan sát thấy chuyển động và phản ứng của *M. macrocopa* sau khi khuấy động nhẹ.

Tất cả các dữ liệu về độc tính được biểu thị bằng giá trị EC_{50} tính theo $\mu\text{g/L}$.

2.2 Phương pháp ước tính giá trị EC_{50}

Đường cong liều – đáp ứng. Giá trị EC_{50} được tính toán từ dữ liệu dựa vào đường cong liều – đáp ứng bằng cách sử dụng các phép tính đơn giản. Phương pháp đơn giản nhất dựa trên tính toán trong định lý hệ số góc tam giác: sử dụng số liệu (Bảng 1) và biểu diễn trên đồ thị đường cong như Hình 1. Chọn hai điểm bất kỳ trên đường cong có tọa độ điểm 1(X_C, Y_B), điểm 2(X_A, Y_D), các điểm A, B, C và D là vị trí tọa độ tham chiếu lần lượt của điểm 1 và điểm 2 trên trục tung và trục hoành của đồ thị. Ta cần xác định tọa độ của điểm EC_{50} ($X_{\text{EC}_{50}}, Y_{\text{EC}_{50}}$). Từ dữ liệu, các giá trị của A, B, C và D đã được biết và có thể dễ dàng tính toán 50% đáp ứng tối đa. Dựa vào tam giác vuông Hình 1a ta có phương trình sau [10]:

$$\frac{y^1}{y} = \frac{x^1}{x} \quad (1)$$

Vì thế ta có:

$$x^1 = \frac{y^1 \times x}{y} \quad (2)$$

$$\text{EC}_{50} = C + (x - x^1) \quad (2)$$

$$\text{Hoặc, } \text{EC}_{50} = D - x^1 \quad (3)$$

$$x = D - C = \text{khoảng liều} \quad (4)$$

$$y \text{ (khoảng đáp ứng giữa A \& B)} = A - B \quad (5)$$

y^1 (khoảng đáp ứng giữa 50% đáp ứng và nồng độ cao nhất kế tiếp) = A – 50% đáp ứng tối đa

$$x^1 = \frac{(A - 50\% \text{ đáp ứng tối đa}) \times x}{y} \quad (6)$$

Từ phương trình (4), có $\text{EC}_{50} = D - x^1$

$$\text{EC}_{50} = D - \frac{(A - 50\% \text{ đáp ứng tối đa}) \times x}{y} \quad (7)$$

Phần mềm thống kê JMP Pro 16. Phân tích dữ liệu đối với mức độ ảnh hưởng của hóa chất DDT lên *M. macrocopa* được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình toán học logit, Boltzmann (sigmoid), log so với độ dốc biến thiên theo đáp ứng chuẩn (liều – đáp ứng) và các mô hình toán học sigmoid không đối xứng (năm tham số) thiết lập sẵn trong phần mềm JMP Pro 16, được trình bày lần lượt trong các phương trình từ (8) đến (11) sử dụng [11].

$$\text{Logit } y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (8)$$

$$\text{Boltzmann (sigmoid) } y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{x - x_0}{dx}\right)} + A_2 \quad (9)$$

$$\text{Liều - đáp ứng } y' = \frac{1}{1 + 10^{[(x_0 - x) \times \text{độ dốc}]}} \quad (10)$$

$$\text{Sigmoid không đối xứng } y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(1 + 10^{[(\log x_b \times \text{độ dốc})^s]})} \quad (11)$$

Trong đó x là log nồng độ, y là đáp ứng, y' là đáp ứng chuẩn (từ 0 đến 100%), A₁ là đáp ứng tối thiểu, A₂ là đáp ứng tối đa, x₀ là trung bình hoặc logEC₅₀, p là lũy thừa, dx là hằng số thời gian, "Hillslope" là độ dốc của đường cong (không có đơn vị), s là tham số đối xứng và x_b là nồng độ tại điểm uốn cong. Đối với mô hình sigmoid không đối xứng, EC₅₀ có thể được tính toán từ các tham số x_b, Hillslope và s bằng cách sử dụng phương trình sau:

$$\log EC_{50} = \log x_b - \left(\frac{1}{\text{Hillslope}} \times \log \left[\left(2 \times \frac{1}{s} \right) - 1 \right] \right) \quad (12)$$

Phần mềm thống kê Origin Pro 8.5.1. Origin Pro là một phần mềm linh hoạt và ứng dụng cao, được trang bị các công cụ để phân tích dữ liệu, thiết lập biểu đồ báo cáo giá trị và được sử dụng trong các ngành khoa học khác nhau. Trong nghiên cứu hiện tại, tác giả đã sử dụng mô hình liều - đáp ứng để thiết lập đường cong bằng chương trình sẵn có trong phần mềm, với công thức gồm bốn tham số được biểu thị là:

$$Y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{[(\log x_0 - \log x) \cdot p]}} \quad (13)$$

Trong đó A₁ đại diện cho đáp ứng tối thiểu và A₂ đại diện cho đáp ứng tối đa; p là độ dốc của đường cong và x₀ là nồng độ tại điểm uốn cong, cũng được xem là giá trị EC₅₀.

Phần mềm thống kê Sigmaplot 14.0. Sigmaplot 14.0 là một phần mềm phân tích dữ liệu và biểu đồ khoa học, cung cấp nhiều lựa chọn phù hợp hơn so với Origin Pro. Sigmaplot cung cấp tích hợp Microsoft Office để dễ dàng truy cập dữ liệu từ bảng tính Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Sigmaplot đòi hỏi nhiều kiến thức chuyên môn hơn các phần mềm khác và không thể hiện trực tiếp các giá trị EC₅₀ mà thông qua một phân tích riêng lẻ của từng điểm dữ liệu; do đó, cần phải tính toán thêm, có thể phức tạp và tốn thời gian. Các phương trình khác nhau được sử dụng để đánh giá thống kê; trong nghiên cứu này sử dụng phương trình (14) có sẵn trong phần mềm Sigmaplot 14.0 để ước tính đường cong liều - đáp ứng:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{(1 + e^{[-(x - x_0)/b]})^c} \quad (14)$$

Trong đó x₀ là nồng độ tại điểm uốn cong, c là hệ số bất đối xứng, b là độ dốc trong khi Y₀ và a tương ứng là giá trị cực tiểu và cực đại của Y.

Phần mềm thống kê IBM SPSS 20. SPSS là viết tắt của cụm từ *Statistical Package for Social Scientists* là một phần mềm quản lý dữ liệu và thống kê toàn diện dành cho các nhà phân tích và nghiên cứu. Khả năng thống kê có thể bao gồm từ tỷ lệ phần trăm đơn giản đến các phân tích phức tạp về phương sai, hồi quy và mô hình tuyến tính tổng quát, cũng như để thiết lập các bảng báo cáo, biểu đồ phân phối. SPSS ban đầu được thiết kế để khảo sát trong phạm vi khoa học - xã hội, dần đã được ứng dụng rộng rãi trong thống kê chung cho nhiều lĩnh vực khoa học và doanh nghiệp. Qua nhiều năm, các nhà nghiên cứu đã phát triển nhiều thử nghiệm và ước tính giúp mở rộng đáng kể phạm vi và khả năng của chương trình cơ bản [12]. Phương trình được áp dụng trong nghiên cứu này như sau:

$$Y = \frac{Y_{\max}}{1 + \left(\frac{X}{EC_{50}} \right)^b} \quad (15)$$

Trong đó: Y_{max} là giá trị trung bình ở mẫu đối chứng, X là nồng độ thử nghiệm

Sử dụng dữ liệu từ Bảng 1, tính toán tỷ lệ tử vong để sử dụng trong mô hình này, thiết lập mô hình ước tính EC₅₀ từ chương trình sẵn có trong phần mềm thống kê IBM SPSS 20 kết hợp với Excel 2016.

3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

EC₅₀ có thể được xác định bằng cách nội suy dữ liệu từ một đường cong liều - đáp ứng hoặc bằng hồi quy phi tuyến tính thông qua các phần mềm thống kê khác nhau, kết quả nghiên cứu được thể hiện lần lượt như sau:

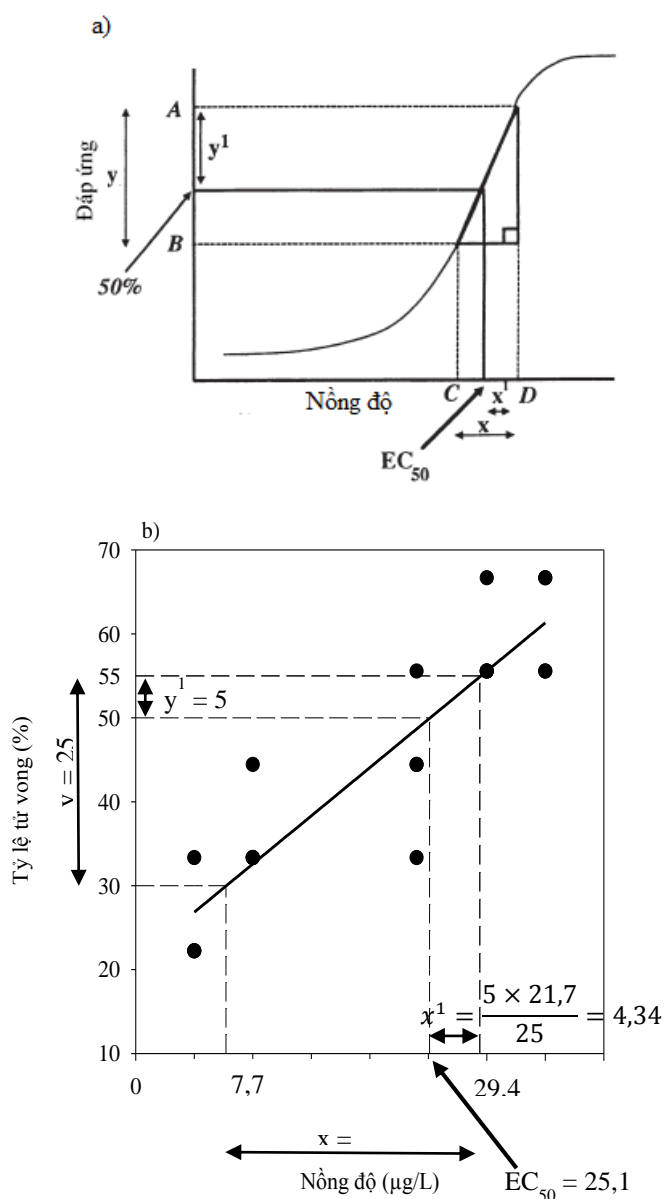
3.1 Đường cong liều - đáp ứng cho tính toán EC₅₀

Kết quả thử nghiệm độc tính của DDT lên *M. macrocopa* sau 24 giờ phơi nhiễm được thể hiện cụ thể qua Bảng 1.

Bảng 1: Tỷ lệ tử vong của *M. macrocopa* sau 24 giờ phơi nhiễm ở các nồng độ DDT khác nhau.

Nồng độ ($\mu\text{g/L}$)	Tỷ lệ tử vong theo lần lặp thử nghiệm (%)				TB \pm SE
	1	2	3	4	
0	0	0	0	0	0 ± 0
5	22,22	22,22	33,33	22,22	$25,00 \pm 2,78$
10	33,33	33,33	33,33	44,44	$36,11 \pm 2,78$
24	44,44	33,33	44,44	55,56	$44,44 \pm 4,54$
30	55,56	55,56	55,56	66,67	$58,33 \pm 2,78$
35	55,56	66,67	55,56	66,67	$61,11 \pm 3,21$

Kết quả tính toán EC_{50} dựa vào đường cong liều – đáp ứng từ số liệu thô (Bảng 1) được trình bày trong Hình 1.



Hình 1: Tính toán giá trị EC_{50} dựa vào đường cong liều – đáp ứng. a) Trong đó: x và x¹ lần lượt là khoảng cách từ D tới C và X_{EC50}; y và y¹ lần lượt là khoảng cách từ A tới B và Y_{EC50}. Và b) kết quả áp dụng tính toán EC_{50} từ dữ liệu Bảng 1.

ƯỚC TÍNH GIÁ TRỊ EC_{50} ...

Áp dụng phương trình (7), ta được:

$$EC_{50} = D - \frac{(A-50\% \text{ đáp ứng tối đa}) \times x}{y} = 29,4 - \frac{(55-50) \times 21,7}{25} = 25,06 \text{ (}\mu\text{g/L)}$$

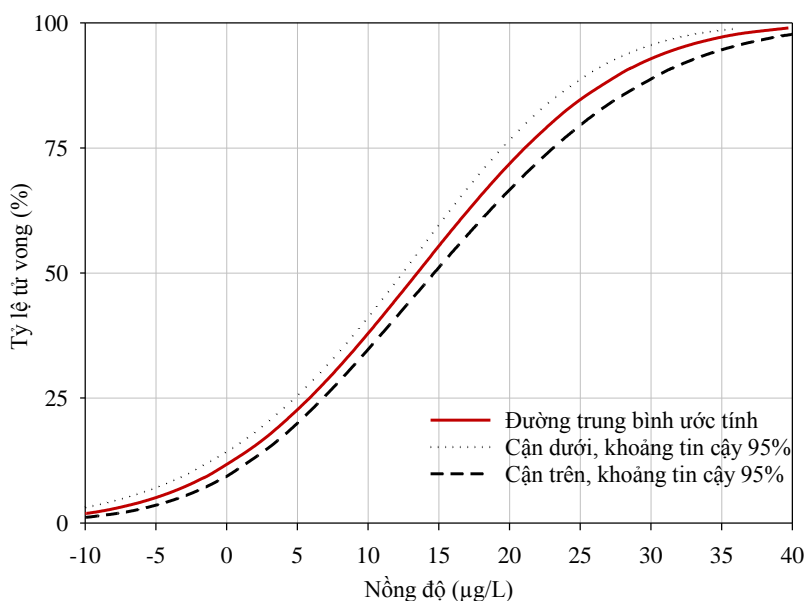
3.2 Ước tính giá trị EC_{50} bằng phần mềm thống kê JMP Pro 16

Kết quả xử lý dữ liệu từ Bảng 1 thông qua phần mềm thống kê JMP Pro 16 cho thấy ảnh hưởng của các nồng độ DDT khác nhau lên *M. macrocopa* sau 24 giờ thử nghiệm (Bảng 2 và Hình 2). Ví dụ dữ liệu từ Bảng 2 được thiết lập với mô hình sigmoid. Giá trị EC_x của thử nghiệm phơi nhiễm *M. macrocopa* với DDT sau 24 giờ với xu hướng độc tính tăng dần từ EC_{20} , EC_{50} , EC_{80} lần lượt là 3,98; 13,48; 22,97 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2: Kết quả phân tích thống kê dữ liệu ($\mu\text{g/L}$) bằng phần mềm thống kê JMP Pro 16 theo mô hình liều – đáp ứng.

EC_x	Ước tính trung bình ($\mu\text{g/L}$)	Cận dưới, khoảng tin cậy 95% ($\mu\text{g/L}$)	Cận trên, khoảng tin cậy 95% ($\mu\text{g/L}$)
20	3,98	2,80	5,02
50	13,48	12,42	14,68
80	22,97	21,18	25,20

Kết quả phân tích cho thấy mối quan hệ giữa tỷ lệ tử vong và nồng độ DDT không phải là một đường thẳng, mà là dạng sigmoid hoặc hình chữ S (Hình 2). Giá trị EC_{50} ước tính thông qua phần mềm thống kê JMP Pro 16 cho kết quả là 13,48 $\mu\text{g/L}$.



Hình 2: Đường cong liều – đáp ứng của *M. macrocopa* đối với các nồng độ DDT khi phân tích bằng phần mềm thống kê JMP Pro 16.

Tương tự, Korolev và cộng sự [13] đã báo cáo giá trị EC_{50} cho mỗi loại thuốc diệt nấm (nồng độ thuốc diệt nấm ức chế 50% sự phát triển của sợi nấm) được xác định bằng cách hồi quy sự phát triển tương đối của sợi nấm so với nồng độ thuốc diệt nấm sử dụng chức năng dự đoán nghịch đảo của phần mềm JMP. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng đã sử dụng phần mềm thống kê JMP để ước tính các giá trị EC_{50} với khoảng tin cậy 95% và dữ liệu được phân tích dưới dạng hồi quy phi tuyến tính [14-16].

3.3 Ước tính giá trị EC₅₀ bằng phần mềm thống kê Origin Pro 8.5.1

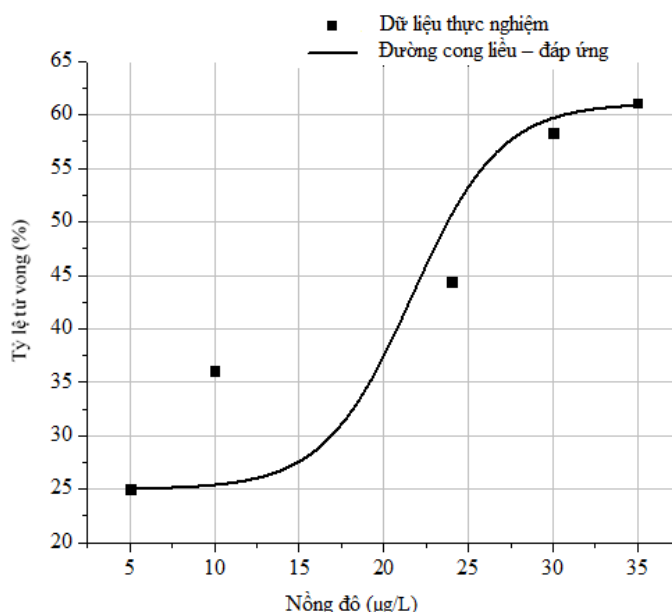
Phần mềm thống kê Origin sử dụng ngôn ngữ lập trình cài sẵn, được thiết kế để tự động hóa các nghiên cứu khoa học. Phần mềm khoa học này có thể được lập trình bằng các lệnh cấp cao để nhập dữ liệu, tạo biểu đồ và thực hiện phân tích.

Giá trị EC₅₀ được ước tính từ dữ liệu liều – đáp ứng trong phơi nhiễm của *M. macrocopa* với DDT được trình bày trong Hình 3 và Bảng 3. Các thông số thống kê bằng phần mềm Origin Pro 8.5.1 từ dữ liệu thô (Bảng 1) cho thấy tỷ lệ tử vong của sinh vật thử nghiệm tăng tuyến tính với nồng độ độc chất, giá trị EC₂₀, EC₅₀, EC₈₀ thu được lần lượt là 3,61; 22,41; 139,16 µg/L (p = 0,76; R² = 0,91) (Bảng 3).

Bảng 3: Kết quả phân tích thống kê dữ liệu bằng phần mềm thống kê Origin Pro 8.5.1 theo mô hình liều – đáp ứng.

Mô hình	Liều – đáp ứng		
Phương trình	$Y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{[(\log x_0 - \log x)p]}}$		
Chi bình phương	21,30		
R bình phương hiệu chỉnh	0,91		
		Giá trị	Sai số chuẩn
	A ₁	0	0
	A ₂	100	0
	LOGx ₀	1,35	0,05
	p	0,76	0,13
	Giới hạn	100	
	EC ₂₀	3,61	
	EC ₅₀	22,41	
	EC ₈₀	139,16	

Giá trị phân tích thống kê thông qua phần mềm Origin Pro 8.5.1 được thể hiện trên đường cong liều – đáp ứng (Hình 3). Kết quả thống kê chứng minh rằng nồng độ DDT ảnh hưởng đến khả năng sống sót của *M. macrocopa* sau 24 giờ phơi nhiễm, tỷ lệ tử vong càng tăng khi nồng độ hóa chất càng tăng.



Hình 3. Đường cong liều – đáp ứng của *M. macrocopa* đối với các nồng độ DDT khi phân tích bằng phần mềm thống kê Origin Pro 8.5.1.

ƯỚC TÍNH GIÁ TRỊ EC₅₀...

EC₅₀ tính toán từ các đường cong đáp ứng được vẽ biểu đồ theo logarit thập phân của nồng độ hóa chất, sử dụng phần mềm Origin với mô hình đường cong liều – đáp ứng [17-19]. Theo đó, nghiên cứu của Efremova Aaron và cộng sự [20] đã tính toán giá trị EC₅₀ bằng phần mềm thống kê Origin Pro 9.1 từ đường cong tiêu chuẩn sử dụng các dung dịch pha loãng liên tiếp của từng loại HCBVTV. Bên cạnh đó, nồng độ ảnh hưởng dựa trên hồi quy (EC_x) của thử nghiệm độc tính kim loại được lấy từ các mô hình hồi quy nồng độ – đáp ứng phù hợp, và khoảng tin cậy 95% tương ứng cũng được ước tính bằng phần mềm Origin [21]. Những kết quả này chứng minh rằng việc thiết lập cơ sở dữ liệu EC₅₀ và đường cong tuyến tính là những công cụ rất quan trọng và không thể thay thế để ước tính độc tính của hóa chất có trong các mẫu môi trường.

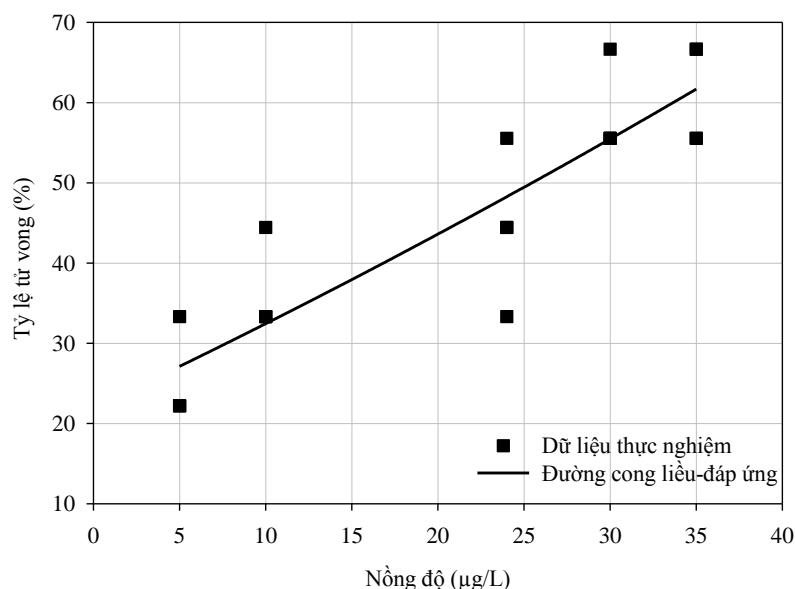
3.4 Ước tính giá trị EC₅₀ bằng phần mềm thống kê Sigmaplot 14.0

Thử nghiệm phơi nhiễm cấp tính (24 giờ) được tiến hành trên *M. macrocopa* đối với DDT sử dụng tỷ lệ tử vong làm điểm cuối đánh giá. Ảnh hưởng của phơi nhiễm cấp tính với DDT lên tỷ lệ tử vong của *M. macrocopa* (Bảng 1) sử dụng phần mềm thống kê Sigmaplot 14.0 được trình bày trong Bảng 4 và Hình 4. Kết quả ước tính thống kê cho thấy tỷ lệ sinh vật thử nghiệm tử vong có xu hướng tăng dần theo nồng độ độc chất.

Bảng 4: Kết quả phân tích thống kê dữ liệu (µg/L) bằng phần mềm thống kê Sigmaplot 14.0 theo mô hình liều – đáp ứng.

R	R bình phương	R bình phương hiệu chỉnh	Sai số chuẩn của ước tính	
0,901	0,812	0,762	7,36	
Hệ số	Giá trị	Sai số chuẩn	t	P
a	2034,43	9,53E+08	2,14E-06	1
b	77,87	22392641	3,48E-06	1
c	0,50	145555,8	3,40E-06	1
x ₀	398,97	71181307	5,61E-06	1
y ₀	-138,93	547741,5	-2,54E-04	0,999

Thế kết quả phân tích thống kê (Bảng 4) vào phương trình (14), ta được giá trị EC₅₀ = Y = 25,70 (µg/L)



Hình 4: Đường cong liều – đáp ứng của *M. macrocopa* đối với các nồng độ DDT khi phân tích bằng phần mềm thống kê Sigmaplot 14.0.

Phương pháp probit được sử dụng như một phương pháp thống kê tham số để ước tính EC₅₀ với khoảng tin cậy 95% [22]. Phân tích bao gồm việc chuyển đổi tỷ lệ tử vong quan sát được thành các giá trị probit bằng phần mềm Sigmaplot [23]. Ngoài ra, phân tích probit được sử dụng để xác định các giá trị EC₅₀ cho sự nảy mầm

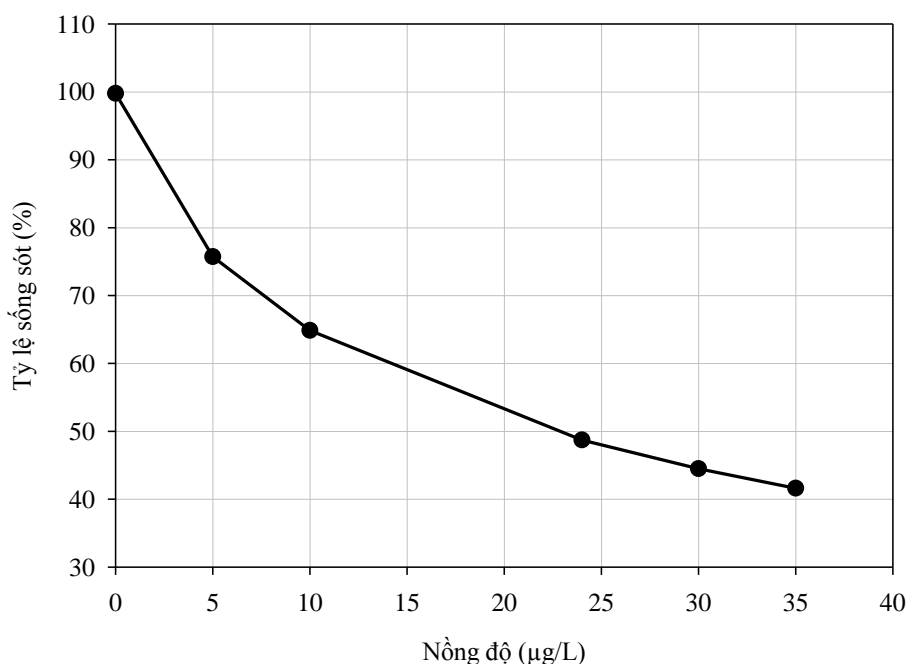
của hạt rau diếp và khác biệt về độ dài trung bình của rễ có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$) bằng phân tích Dunnett thông qua phần mềm Sigmaplot [24]. Do vậy, Sigmaplot đã được chứng minh ứng dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu đánh giá độc tính để ước tính giá trị EC_{50} từ dữ liệu thực nghiệm [25-27].

3.5 Ước tính giá trị EC_{50} bằng phần mềm thống kê IBM SPSS 20

Thông qua phần mềm IBM SPSS 20, kết quả phân tích thống kê dữ liệu (Bảng 4) từ thử nghiệm đánh giá độc cấp tính của DDT lên *M. macrocopa* (Bảng 1) được thể hiện trên đường cong liều – đáp ứng (Hình 5). Theo mô hình liều – đáp ứng, giá trị EC_{50} ước tính là 22,55 $\mu\text{g/L}$ ($SE = 2,82 \mu\text{g/L}$) với khoảng tin cậy 95% ($p < 0,05$) (Bảng 5).

Bảng 5: Kết quả phân tích thống kê dữ liệu ($\mu\text{g/L}$) bằng phần mềm thống kê IBM SPSS 20 theo mô hình liều – đáp ứng.

Thông số	Ước tính	Sai số chuẩn	Khoảng tin cậy 95%	
			Cận dưới	Cận trên
Y_{\max}	99,77	3,27	92,97	106,57
EC_{50}	22,55	2,82	16,68	28,43
b	0,76	0,10	0,55	0,98



Hình 5: Đường cong liều – đáp ứng của *M. macrocopa* đối với các nồng độ DDT khi phân tích bằng phần mềm thống kê IBM SPSS 20.

SPSS được xem là phần mềm thống kê phù hợp để thực hiện các phép tính giá trị EC_{50} [8]. Do đó, EC_{50} và các khoảng tin cậy 95% của thử nghiệm đánh giá độc cấp tính trong nghiên cứu của Verma [28] được tính bằng phương pháp phân tích probit sử dụng phần mềm SPSS, kết quả được xem là có ý nghĩa với $p < 0,05$ [29, 30]. Đồng thời, SPSS cũng được sử dụng để kiểm tra sự cân bằng phương sai trên các bộ dữ liệu EC_{50} khác nhau [31]. Nghiên cứu của Hương và cộng sự [32] đã tiến hành đánh giá độc cấp tính của DDT trên *M. macrocopa*, áp dụng phần mềm thống kê SPSS thu được kết quả EC_{50} (13,5 $\mu\text{g/L}$) nhỏ hơn nghiên cứu hiện tại (22,55 $\mu\text{g/L}$). Sự khác biệt giữa hai nghiên cứu do ảnh hưởng từ các yếu tố trong và ngoài môi trường nuôi cấy dẫn đến độ nhạy cảm của *M. macrocopa* với hóa chất khác nhau, đồng thời điều kiện phòng thí nghiệm và sai số trong quá trình thực nghiệm cũng ảnh hưởng đến giá trị EC_{50} .

Tóm lại, kết quả ước tính giá trị EC₅₀ từ thử nghiệm đánh giá độc cấp tính (24 giờ) của DDT lên *M. macrocopa* thông qua mô hình đường cong liều – đáp ứng và bốn phần mềm thống kê JMP Pro 16, Origin Pro 8.5.1, Sigmaplot 14.0, IBM SPSS 20 lần lượt là 25,06; 13,48; 22,41; 25,70 và 22,55 (µg/L). Từ những kết quả nghiên cứu trên cho thấy trong một bộ dữ liệu, giá trị EC₅₀ thu được có sự khác biệt (SE = 2,19 µg/L) giữa các mô hình áp dụng. Sự chênh lệch này có thể là do mỗi phương pháp, phần mềm thống kê được thiết lập với phương trình riêng biệt trong mô hình hồi quy để đạt mục tiêu phân tích chung, trong nghiên cứu này là giá trị EC₅₀. Đồng thời, hình thức phân bố dữ liệu thực nghiệm ở mỗi phần mềm thống kê cũng là yếu tố dẫn đến sự khác biệt.

Mô hình hồi quy cho thấy các phần mềm thống kê hoạt động theo nhiều cách khác nhau. Trong đó, JMP Pro 16 hiển thị giá trị EC₅₀ và các chỉ số chưa được thiết lập trong phương trình của mô hình hồi quy. Trong khi các phần mềm khác, như Origin Pro 8.5.1 và Sigmaplot 14.0 chỉ hiển thị các tham số được liệt kê trong phương trình. Đồng thời, JMP Pro 16 là phần mềm ước đoán độc tính nhạy nhất (EC₅₀ nhỏ nhất) so với các phần mềm còn lại, chứng minh đây là phần mềm phù hợp nhất trong ước tính EC₅₀ đối với thử nghiệm độc tính mô hình phòng thí nghiệm.

4 KẾT LUẬN

Thông tin về độc tính thủy sinh rất cần thiết trong đánh giá rủi ro môi trường nhằm xác định mối nguy tiềm ẩn của các hóa chất mới xuất hiện và đang tồn tại. Trong đó, EC₅₀ là giá trị sử dụng phổ biến, thu được thông qua thử nghiệm độc cấp tính của DDT lên *M. macrocopa* sau 24 giờ phơi nhiễm. Từ kết quả quan sát tỷ lệ tử vong của cá thể thử nghiệm, áp dụng phương pháp tính toán dựa trên đường cong liều – đáp ứng và các phần mềm thống kê khác nhau để ước tính giá trị EC₅₀. Kết quả phân tích cho thấy giá trị EC₅₀ có sự chênh lệch giữa các phương pháp, phần mềm theo thứ tự: Sigmaplot 14.0 (25,70 µg/L) > đường cong liều – đáp ứng (25,06 µg/L) > IBM SPSS 20 (22,55 µg/L) > Origin Pro 8.5.1 (22,41 µg/L) > JMP Pro 16 (13,48 µg/L). Sự chênh lệch giữa các giá trị EC₅₀ (SE = 2,19 µg/L) của DDT lên *M. macrocopa* sau 24 giờ phơi nhiễm, kết quả thống kê có thể khác nhau giữa các phần mềm, điều này là do phương trình thiết lập và mô hình phân bố dữ liệu có sự khác biệt. Trong số các phần mềm được xem xét trong nghiên cứu, JMP Pro 16 là phần mềm duy nhất có thể dễ dàng truy xuất các chỉ số khác làm tăng độ tin cậy (ngoài các giá trị trong phương trình) dựa trên kết quả phân tích hồi quy.

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành nghiên cứu này, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh (IUH) và Viện Khoa học Công nghệ và Quản lý Môi trường (IESEM) – IUH. Tôi cũng xin cảm ơn sinh viên của IESEM đã hỗ trợ nhiệt tình trong quá trình nghiên cứu. Đặc biệt, tôi xin cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã cung cấp sinh vật cho thử nghiệm đánh giá độc tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Popp, K. Pető, and J. Nagy, *Impact of pesticide productivity on food security*. Sustainable Agriculture Reviews. Springer International Publishing, Switzerland, 2014.
- [2] D. Suchahyo, N. M. van Straalen, A. Krave, and C. A. van Gestel, Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 69, no. 3, pp. 421–427, 2008.
- [3] K. Bunzel, M. Liess, and M. Kattwinkel, Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects, *Environmental Pollution*, vol. 186, pp. 90–97, 2014.
- [4] J. Wang, J. Wang, J. Liu, J. Li, L. Zhou, and H. Zhang, The evaluation of endocrine disrupting effects of tert-butylphenols towards estrogenic receptor α , androgen receptor and thyroid hormone receptor β and aquatic toxicities towards freshwater organisms, *Environmental Pollution*, vol. 240, pp. 396–402, 2018.
- [5] K. Kamrunnahar, A. Md, U. C. Jeong, and S. J. Kang, Mass culture of *Moina macrocopa* using organic waste and its feeding effects on the performance of *Pagrus major* larvae, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, vol. 45, no. 1, pp. 75–80, 2019.
- [6] S. H. Nam, C. Y. Yang, and Y. J. An, Effects of antimony on aquatic organisms (Larva and embryo of *Oryzias latipes*, *Moina macrocopa*, *Simocephalus mixtus*, and *Pseudokirchneriella subcapitata*), *Chemosphere*, vol. 75, no. 7, pp. 889–893, 2009.
- [7] X. Yi, S. W. Kang, and J. Jung, Long-term evaluation of lethal and sublethal toxicity of industrial effluents using *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 178, pp. 982–987, 2010.

- [8] J. L. Li, X. Y. Liu, J. T. Xie, Y. L. Di, and F. X. Zhu, A comparison of different estimation methods for fungicide EC₅₀ and EC₉₅ values, *Journal of Phytopathology*, vol. 163, no. 4, pp. 239–244, 2015.
- [9] J. D. Cooney, Freshwater Tests, In *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*; Rand, G.M., Petrocelli, S.R., Eds.; Washington Hemisphere Publishing Corporation: Washington, DC, USA, pp. 71–102, 1995.
- [10] B. Alexander, D. J. Browse, S. J. Reading, and I. S. Benjamin, A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC₅₀, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 41, no. 2-3, pp. 55–58, 1999.
- [11] R. Suriyatem, R. A. Auras, P. Intipunya, and P. Rachtanapun, Predictive mathematical modeling for EC₅₀ calculation of antioxidant activity and antibacterial ability of Thai bee products, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 7, no. 9, pp. 122-133, 2017.
- [12] M. J. Norusis, SPSS 11.0 guide to data analysis. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, pp. 2002.
- [13] N. Korolev, M. Mamiev, T. Zahavi, and Y. Elad, Resistance to fungicides among *Botrytis cinerea* isolates from tomato and other hosts in Israel, *Acta Horticulturae*, vol. 808, pp. 367–376, 2009.
- [14] K. C. Albernaz, B. L. Merlin, S. Martinelli, G. P. Head, and C. Omoto, Baseline susceptibility to Cry1Ac insecticidal protein in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil, *Journal of Economic Entomology*, vol. 106, no. 4, pp. 1819–1824, 2013.
- [15] J. R. Farias, R. J. Horikoshi, A. C. Santos, and C. Omoto, Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil, *Journal of Economic Entomology*, vol. 107, no. 6, pp. 2182–2189, 2014.
- [16] S. Nagashima, T. Tsukamoto, J. Isota, T. Kako, and M. Tojo, Control effects of metalaxyl-M and azoxystrobin on stem and root rot pathogens of *Hydrangea macrophylla*, *Annual Report of The Kansai Plant Protection Society*, vol. 62, pp. 153–156, 2020.
- [17] X. D. Hou, Q. P. Liu, T. J. Smith, N. Li, and M. H. Zong, Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids, *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, pp. e59145, 2013.
- [18] Q. Sun, F. Ye, H. Liang, H. Liu, C. Li, and R. Lu, Bardoxolone and bardoxolone methyl, two Nrf2 activators in clinical trials, inhibit SARS-CoV-2 replication and its 3C-like protease, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 1, pp. 212, 2021.
- [19] Y. Fu, L. Qiao, Y. Cao, X. Zhou, Y. Liu, and X. Ye, Structural elucidation and antioxidant activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves, *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, pp. e96162, 2014.
- [20] S. Efremova Aaron, K. Toseska- Trajkovska, S. Cekovska, and J. J. Aaron, Establishment of an EC₅₀ database of pesticides using a *Vibrio fischeri* bioluminescence method, *Luminescence*, vol. 34, no. 5, pp. 508–511, 2019.
- [21] S. Manzo, S. Buono, and C. Cremisini, Cadmium, lead and their mixtures with copper: *Paracentrotus lividus* embryo toxicity assessment, prediction, and offspring quality evaluation, *Ecotoxicology*, vol. 19, no. 7, pp. 1209–1223, 2010.
- [22] D. J. Finney, *Probit Analysis*. Cambridge University Press, New York, 1971.
- [23] B. C. Kim, K. S. Park, S. D. Kim, and M. B. Gu, Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, no. 5-6, pp. 821–826, 2003.
- [24] T. M. Phillips, D. Liu, A. G. Seech, H. Lee, and J. T. Trevors, Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 24, no. 2, pp. 132–139, 2000.
- [25] S. N. Arisht, P. M. Abdul, J. Jasni, N. H. Mohd Yasin, S. K. Lin, S. Y. Wu, M. S. Takriff, and J. M. Jahim, Dose-response analysis of toxic effect from palm oil mill effluent (POME) by-products on biohydrogen producing bacteria - A preliminary study on microbial density and determination of EC₅₀, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 203, pp. 110991, 2020.
- [26] O. Kuzbari, C. M. Peterson, M. R. Franklin, L. B. Hathaway, E. B. Johnstone, A. O. Hammoud, and J. G. Lamb, Comparative analysis of human CYP3A4 and rat CYP3A1 induction and relevant gene expression by bisphenol A and diethylstilbestrol: Implications for toxicity testing paradigms, *Reproductive Toxicology*, vol. 37, pp. 24–30, 2013.
- [27] Z. A. Noel, J. Wang, and M. I. Chilvers, Significant influence of EC₅₀ estimation by model choice and EC₅₀ type, *Plant Disease*, pp. 1–27, 2017.
- [28] Y. Verma, Toxicity assessment of dye containing industrial effluents by acute toxicity test using *Daphnia magna*, *Toxicology and Industrial Health*, vol. 27, no. 1, pp. 41–49, 2011.
- [29] S. J. Kim, E. C. Yim, I. T. Park, S. W. Kim, and H. Cho, Comparison of the acute toxicities of novel algicides, thiazolidinedione derivatives TD49 and TD53, to various marine organisms, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 30, no. 12, pp. 2810–2816, 2011.
- [30] Y. Li, Y. Shan, and X. Lin, Effect of acute hypervolemic hemodilution of 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 on the EC₅₀ of propofol at two clinical endpoints in patients, *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 11, pp. 110–116, 2015.

[31] H. J. Liang, J. L. Li, Y. L. Di, A. S. Zhang, and F. X. Zhu, Logarithmic transformation is essential for statistical analysis of fungicide EC₅₀ values, *Journal of Phytopathology*, vol. 163, no. 6, pp. 456–464, 2015.

[32] T. T. T. Huong, N. X. Tong, L. H. Anh, and L. V. Hau, The impacts of some plant protection chemical OCPs on two crustacean species *Daphnia magna* and *Moina macrocop*, *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, vol. 22, no. 1, pp. 95–102, 2022.

ESTIMATION OF EC₅₀ VALUES IN ACUTE TOXICITY TEST THROUGH SEVERAL STATISTICAL SOFTWARES

NGUYEN XUAN TONG

Institute for the Environmental Science, Engineering & Management, Industrial University of Ho Chi Minh City

nguyensexuantong@iuh.edu.vn

Abstract. The chemical toxicity test on crustaceans is a commonly used model to estimate 50% effect concentrations (EC₅₀) to identify potential risks to aquatic systems. The objective of the study was the apply statistical softwares in estimating EC₅₀ values for a laboratory model toxicity results. In the present study, the EC₅₀ value of the pesticide Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT) during acute exposure (24h) to *Moina macrocopa* (*M. macrocopa*) was estimated using a dose-response curve and four statistical softwares such as JMP Pro 16, Origin Pro 8.5.1, Sigmaplot 14.0, IBM SPSS 20. The estimated EC₅₀ value when applying the dose-response curve is 25.06 (µg.L⁻¹), for statistical softwares is 13.48, 22.41, 25.70 and 22.55 (µg.L⁻¹), respectively. The EC₅₀ value is essentially statistically different with the biggest difference being the JMP Pro 16 software (~10 µg.L⁻¹). The different setup equation and data distribution pattern of each software lead to a different EC₅₀ values (standard error (SE) = 2.19 µg.L⁻¹) for a toxicity data. All statistical software obtained EC₅₀ values, but JMP Pro 16 analysis showed the best performance due to the ability to extract indicators not established in the regression model's equation.

Keywords. EC₅₀ estimation, toxicity, statistical software.

Ngày nhận bài: 29/06/2022

Ngày chấp nhận đăng: 26/12/2022