Системы контроля окружающей среды № 1 (51) 2023

EDN: https://elibrary.ru/mohbbz

УДК 504.064.38 DOI: 10.33075/2220-5861-2023-1-127-134

ПРОГРАММНО-АППАРАТНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРОВ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *P. CAUDATUM*

О.В. Смолова, А.С. Ковалевская, М.И. Семенова, А.В. Смирнов

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), РФ, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5
E-mail: ovsmolova@etu.ru

Рассматривается реализация программного-аппаратного комплекса для анализа двигательной активности инфузорий *P.Caudatum*. На воздействие токсичных веществ парамеции отвечают, в первую очередь, изменением двигательной активности. Анализ параметров движения позволяет сделать вывод о наличии токсичности в исследуемой пробе. Парамеции проявляют разные типы двигательной активности в зависимости от воздействующего вещества, поэтому возможно введение коэффициентов, сигнализирующих о наличии того или иного вещества в пробе. Созданный программно-аппаратный комплекс позволяет автоматизировать процесс анализа двигательной активности и служит базой для проведений серийных экспериментов.

Ключевые слова: биотестирование, токсичность, траектория движения, программный комплекс, тяжелые металлы, *P.Caudatum.*

Поступила в редакцию: 09.11.2022. После доработки: 23.01.2023.

Введение. Водные экосистемы всегда были уязвимым объектом, особенно остро ощущающим на себе воздействие со стороны промышленности, энергетики, да и вообще любой хозяйственной деятельности. Комплекс природоохранных мероприятий включают в себя оценку состояния водных объектов, и важное значение имеет идентификация источников загрязнения для грамотного проведения экологозащитных действий. Для понимания комплексного воздействия на экосистемы биотестирование играет важную роль, позволяя оперативно выявлять нарушения в составе водной среды и прогнозировать экологически значимые последствия влияния загрязняющих веществ на окружающую среду. Использование биотестовых методик позволяет определять степень опасности контролируемого объекта и подключать химико-аналитические методы только в необходимых случаях. Такой подход повышает оперативность проведения экологического контроля, что способствует более эффективному использованию временных и, как следствие, материальных ресурсов исследователей.

Разрабатывая биотестовые методики по выявлению токсичности различных веществ, перед исследователями встает ряд вопросов, которые касаются правильной постановки эксперимента, такие как:

- Обладает ли данное вещество острой токсичностью?
- Какая кратность разбавления необходима для исчезновения острой токсичности исследуемого вещества?
- При какой концентрации вещество не оказывает влияния на тест-организмы?
- Как меняется токсичность вещества под воздействием внешних факторов?
- Какой чувствительностью обладают тест-организмы по отношению к исследуемому веществу?

Первым этапом получения токсикологической оценки исследуемого вещества является определение концентрации острого токсического действия. На основании данных, полученных на первом этапе эксперимента, строятся дальнейшие исследования. В острых токсикологических экспериментах одной из самых однозначных и распространенных явля-

ется тест-функция гибели 50% организмов $ЛК_{50}$ (летальная концентрация). Время воздействия токсиканта и способа его введения выбирается исходя из особенностей отклика используемых тест-организмов.

Для глубокого понимания, какое воздействие на организмы оказывает исследуемое вещество, необходимо проводить длительные опыты, т.е. хронические эксперименты. Безусловно, проведение хронических экспериментов позволяет получить более достоверную картину воздействия исследуемых веществ на состояние лабораторных культур, используемых в анализе. Однако, хронические опыты отличаются высокой трудоёмкостью, что является значительным препятствием при проведении серийных испытаний исследуемых веществ.

Современные требования, предъявляемые к разрабатываемым методикам, заключаются в возможности ранней диагностики загрязнения, т.е. выявлению минимальных концентраций, способных вызвать изменения в состоянии чувствительных тест-организмов.

В данном случае исследователей интересует не количество особей, погибших за определенный период, а различные паталогические проявления разной силы и частоты встречаемости. Так, например, использование в качестве тест-функции изменения в двигательной активности клеток позволяет наиболее оперативно зафиксировать токсическое действие вещества в нелетальных дозах. Поэтому здесь целесообразно оперировать понятием эффективной концентрации. Эффективная концентрация ($ЭК_{50}$) – это такая концентрация, при которой наблюдается отклик тест-функций организмов, не являющийся смертельной. [1]

Материалы и методы. В качестве тест-объекта используются высокочувствительные организмы – инфузории *P.Caudatum*. При взаимодействии с токсичными веществами инфузории в первую очередь реагируют изменением параметров своего движения. В качестве оценок (параметров) подвижности могут выступать скорость и ускорение движения отдельных микроорганизмов, время движения, траектории перемещения и т.д. [2] Движение может быть различным – направленным или хаотичным, поэтому выбор конкретных параметров подвижности в значительной степени определяется задачей исследования.

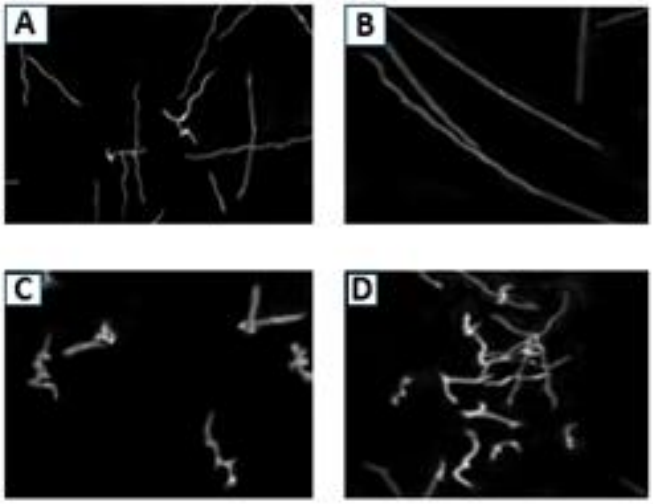


Рис. 1. Результирующие снимки движения инфузорий под воздействием водных растворов химических веществ: A) Культурная среда; B) $Pb(NO_3)_2$; C) $CuSO_4$; D) CH_3COOH

Fig. 1. The resulting images of the movement of ciliates under the influence of aqueous solutions of chemicals: A) Cultural environment; B) $Pb(NO_3)_2$; C) $CuSO_4$; D) CH_3COOH

В работах Н.В. Котова [3] определены 11 типов двигательных программ, которые проявляют инфузории, в зависимости от воздействующих факторов.

Параметры движения микроорганизмов зависят от концентрации вводимого токсиканта, а также от концентрации самих клеток во взвеси. Ранее проведенные исследования показали различие в траекториях движения под воздействием токсичных веществ (рис.1) [4].

Чтобы получать достоверные результаты эксперимента была определена необходимая и достаточная концентрация клеток инфузорий, которая составляет 200–300 кл/мл. При такой концентрации клеток, инфузории не оказывают взаимного влияния на оцениваемые параметры движения.

Для проведения исследований была разработана биотехническая система, где в едином контуре сочетаются биологические объекты, технические и программные средства.

Чувствительным датчиком, регистрирующим изменения в двигательной активности клеток, выступает камера с разрешением не менее 12 Мпикс.

Для обеспечения эффективной освещенности используется светодиодная лента по периметру кюветы.

Кювета с микроорганизмами размещается на подвижной площадке, что позволяет добиться тонкой фокусировки камеры на исследуемых объектах.

Для исследований применялась плоская фотометрическая кювета с длиной оптического пути 1 мм. Использование такой кюветы обеспечивает нахождение всех микроорганизмов в фокусе чувствительного фотоприёмника. В используемой кювете инфузории *P.Caudatum* лишены возможности двигаться во всех желаемых направлениях, таким образом при фотофиксации обеспечивается нахождение клеток в одной плоскости. Такое положение клеток в кювете является важным условием при регистрации изменений в двигательной активности клеток и не затрудняет дальнейшую статистическую обработку.

Макет установки для фоторегистрации двигательной активности *P.Caudatum* представлен на рис. 2.

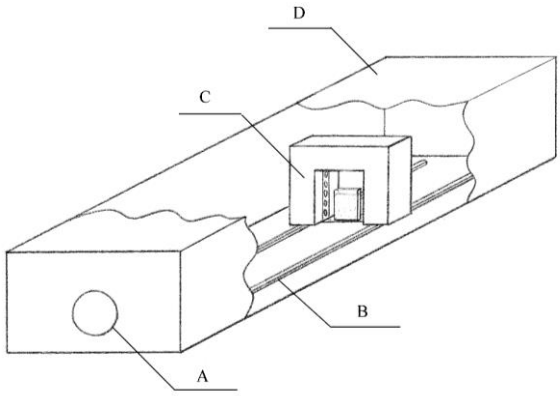


Рис. 2. Макет установки для фоторегистрации двигательной активности *P.Caudatum*
A) Отверстие для объектива камеры; B) Рельсы для перемещения кюветного модуля;
C) Кюветный модуль; D) Светонепроницаемый корпус

Fig. 2. Layout of the installation for photographic recording of motion activity *P. Caudatum* A) Hole for camera lens; B) Rails for moving the cuvette module; C) Cuvette module; D) Lightproof housing

Для получения численных характеристик двигательной активности, таких как: частота смены направлений движения, величина угла поворота, величина свободного пробега, изменения в линейной скорости микроорганизмов, было разработано специализированное программное обеспечение.

Для разработки алгоритма были определены исходные данные: технические характеристики биотехнической системы и физическая модель движения тела микроорганизма, а также факторы, оказывающие влияние на оценку параметров подвижности.

При работе с цифровыми изображениями инфузорий особое внимание уде-

ляется анализу возможных помех. Во взвесь инфузорий могут попадать остатки корма или продукты метаболизма, поэтому перед проведением анализа лабораторную культуру инфузорий несколько раз отмывают по стандартным методикам. Данный вид помех схож по своим характеристикам с исследуемыми объектами, что может негативно сказаться на результатах анализа. Также следует тщательно готовить кюветы для проведения анализа: исключить возможность налипания пыли снаружи кюветы, оставления отпечатков пальцев, для чего кювету следует перемещать только за боковые стенки.

Алгоритм оценки параметров подвижности *P. Caudatum* представлен на рис. 3 [5].

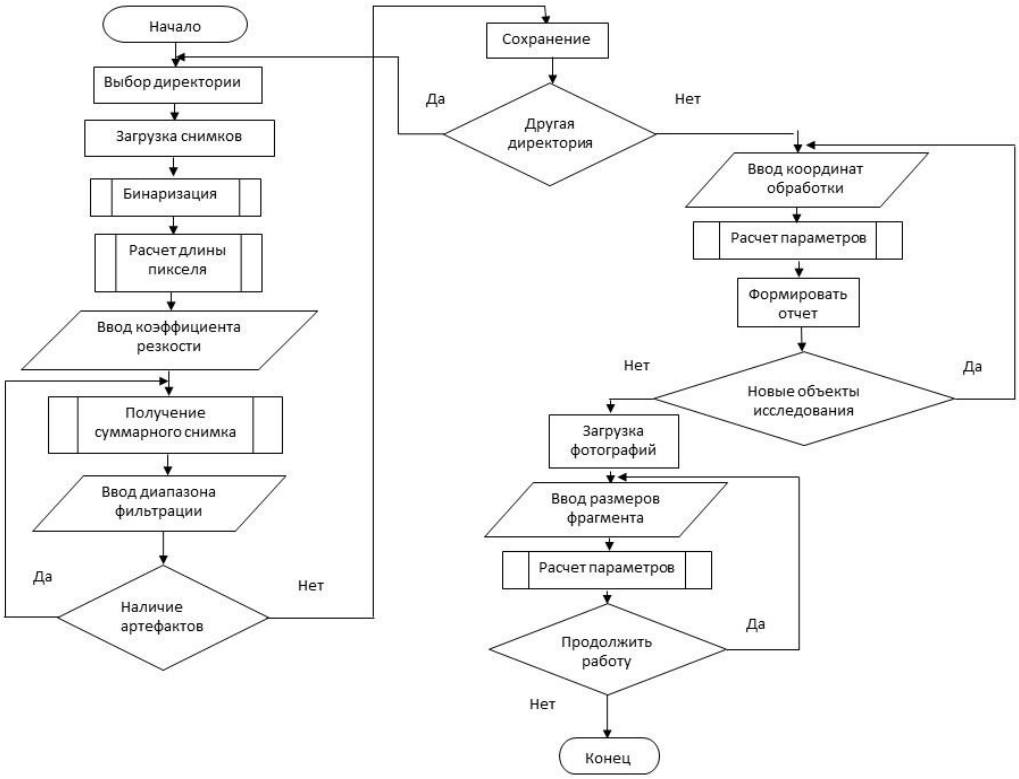


Рис. 3. Алгоритм оценки параметров подвижности *P.Caudatum*
Fig. 3. Algorithm for estimating *P.Caudatum* movement parameters

Программное обеспечение создано на базе пакета прикладных программ Matlab.

Рабочее окно программы разделено на четыре блока: "Обработка изображений", "Оценка параметров подвижности", "Моделирование траектории движения", "Показатель яркости".

Обработка изображений. В данном блоке программа производит обработку изображений, позволяя получить бинарное и инвертированное изображение, получает гистограмму распределения яркостей и удаляет артефакты со снимка по заданным параметрам.

Оценка параметров подвижности. Данный блок предназначен для получения суммарного снимка путем наложения кадров, полученный "Суммарный снимок" используется для оценки параметров: количество клеток в кювете (среднее значение для всех кадров), средний размер клетки, длина клетки, длина траектории, скорость движения, угол поворота.

Расчетные значения отображаются непосредственно в рабочем окне программы и могут быть записаны в текстовый документ.

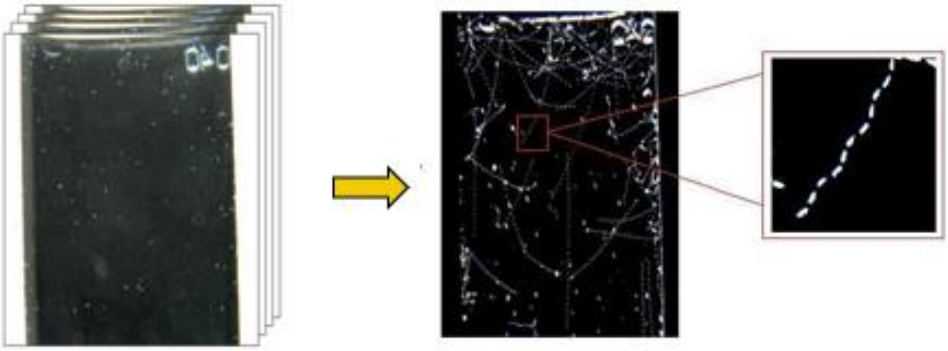
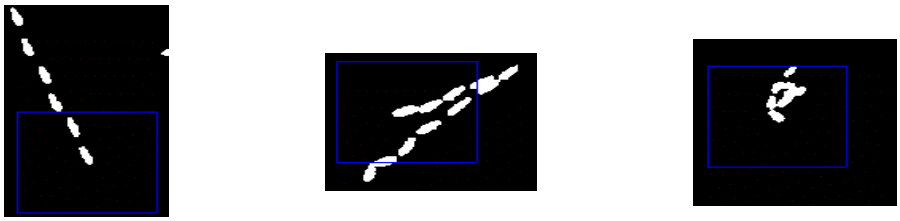


Рис. 4. Принцип получения изображений *P.Caudatum* в среде MatLab
Fig. 4. Algorithm for estimating *P.Caudatum* movement parameters.

Моделирование траектории. Используя математические формулы, описывающие проекцию спиральной траектории на ось [6, 7], программа выполняет задачу по моделированию траектории в зависимости от вводимых оператором параметров: скорость, время, угол поворота, частота съемки, коэффициент увеличения.

Показатель яркости. Данный блок программы предназначен для оценки яркости снимка, который соотносится с типом движения инфузорий. На первом снимке серии выделяется фрагмент изображения, в центре которого находится одна клетка парамеции, затем контуры фрагмента переносятся на суммарный снимок. После этого производится оценка среднего значения яркости двух фрагментов, их отношение дает число от 0 до 1. Используя данный блок можно получить диапазон показателя яркости для каждого типа движения.



Движение по прямой
Показатель яркости = 0,34435

Реакция избегания
Показатель яркости = 0,16228

«Стохастический клубок»
Показатель яркости = 0,17914

Рис. 5. Значения показателя яркости, рассчитанного для различных типов движения парамеций
Fig. 5. Values of the brightness index calculated for various types of movement of paramecium

Полученные результаты. При разработке биотестовых методик особое значение имеет выбор модельных токсикантов [8]. В первую очередь, интерес представляют потенциально токсичные вещества антропогенного происхождения. Особое внимание уделяется тяжелым металлам, как наиболее распространенной группе загрязняющих веществ. При помощи программно-аппаратного комплекса были проведены исследования по оценке параметров двигательной активности инфузорий под воздействием соединений тяжелых металлов, таких как: $CuSO_4$, $ZnSO_4$ и $Pb(NO_3)_2$. Фотофиксация проходила сразу после введения токсиканта, через 2 минуты и через 5 минут после смешивания. Численные значения параметров движения инфузорий под воздействием химических веществ, полученные с помощью программно-аппаратного комплекса представлены в табл. 1–3.

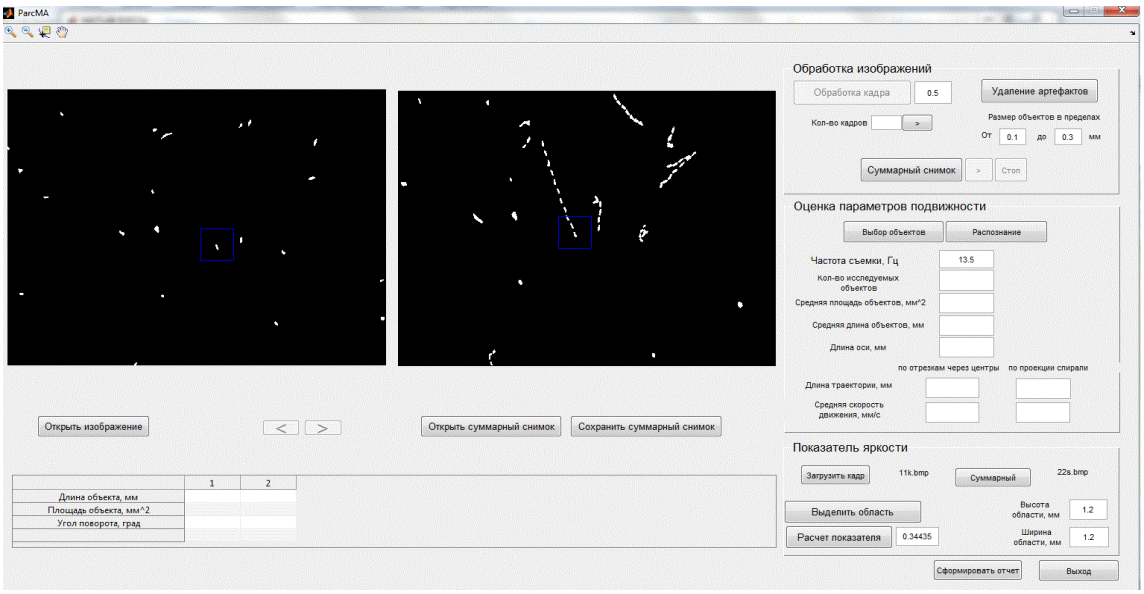


Рис. 6. Рабочее окно программы ParcMA, предназначенной для оценки параметров подвижности инфузорий *P.Caudatum*
Fig. 6. The working window of the ParcMA program, designed for assessing the parameters of movement of ciliates *P. Caudatum*

Таблица 1. Значения средней скорости движения и среднего угла поворота инфузорий *P.Caudatum* под воздействием водного раствора ZnSO4 в различных концентрациях

Концентрация, мг/л		**0,01**				**0,1**				**1**				**10**				**100**			
Характеристики	Время	номер эксперимента			ср.знач.	номер эксперимента			ср.знач.	номер эксперимента			ср.знач.	номер эксперимента			ср.знач.	номер эксперимента			ср.знач.
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Средняя скорость, мм/с	0 мин	0,67	0,44	0,44	0,52	1,21	0,56	0,48	0,75	0,76	0,57	0,76	0,70	0,53	0,48	0,41	0,47	0,45	0,55	0,52	0,50
	2 мин	0,55	0,64	0,51	0,57	1,01	0,65	0,58	0,75	0,94	0,56	0,70	0,74	1,00	0,58	0,26	0,61	0,53	0,53	0,53	0,53
	5 мин	0,62	0,74	0,60	0,65	1,13	0,90	0,45	0,83	0,69	0,63	0,82	0,71	1,06	0,50	0,21	0,59	0,75	0,57	0,42	0,58
Средний угол, град.	0 мин	40,06	45,52	42,30	42,63	31,09	40,67	37,75	36,50	33,33	44,43	25,95	34,57	60,96	50,53	28,70	46,73	56,05	41,10	36,54	44,57
	2 мин	37,42	42,16	34,94	38,17	31,83	45,85	35,04	37,57	34,12	41,27	32,19	35,86	37,17	34,30	32,44	34,64	44,86	47,84	30,92	41,21
	5 мин	33,83	35,53	29,84	33,07	33,05	38,03	31,79	34,29	41,83	43,08	28,32	37,74	40,25	41,31	35,05	38,87	35,01	28,02	23,38	28,80

Таблица 2. Значения средней скорости движения и среднего угла поворота инфузорий *P.Caudatum* под воздействием водного раствора $CuSO_4$ в различных концентрациях

Концентрация, мг/л		**0,01**				**0,1**				**1**				**10**			
арактеристи	Время	номер эксперимента			ср.знач	номер эксперимента			ср.знач	номер эксперимента			ср.знач	номер эксперимента			ср.знач
		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Средняя скорость, мм/с	0 мин	0,65	0,55	0,73	0,64	1,14	0,61	2,78	1,51	0,65	0,67	1,06	0,79	1,01	0,74	0,88	0,88
	2 мин	0,81	0,64	0,63	0,69	0,52	0,52	0,77	0,61	1,30	0,82	0,75	0,96	1,25	0,65	0,92	0,94
	5 мин	0,75	0,67	0,59	0,67	0,40	0,52	0,78	0,56	0,86	0,99	0,58	0,81	0,98	0,77	1,02	0,92
Средний угол, град.	0 мин	28,48	38,75	51,00	39,41	29,63	43,60	34,05	35,76	41,38	42,80	56,34	46,84	33,35	42,08	54,40	43,28
	2 мин	32,08	37,60	44,01	37,90	44,63	39,29	35,71	39,88	35,51	29,98	44,22	36,57	25,36	39,90	43,20	36,15
	5 мин	38,60	36,80	37,76	37,72	45,02	39,87	37,74	40,88	44,69	24,45	34,90	34,68	24,20	44,30	48,80	39,10

Таблица 3. Значения средней скорости движения и среднего угла поворота инфузорий *P.Caudatum* под воздействием водного раствора $Pb(NO_3)_2$ в различных концентрациях

Концентрация, мг/л		**0,01**				**0,10**				**1,00**			
Характеристики	Время	номер эксперимента			ср.знач	номер эксперимента			ср.знач	номер эксперимента			ср.знач
		1	2	3		1	2	3		1	2	3	
Средняя скорость, мм/с	0 мин	0,69	2,11	1,94	1,58	1,24	4,00	2,47	2,57	0,81	4,35	1,91	2,36
	2 мин	0,84	2,33	2,73	1,97	0,99	3,10	2,60	2,23	0,75	5,49	2,25	2,83
	5 мин	0,97	1,94	2,23	1,71	1,07	4,26	3,38	2,90	0,91	4,21	2,01	2,38
Средний угол, град.	0 мин	32,47	27,57	57,88	39,30	30,57	29,20	46,25	35,34	34,11	22,56	31,58	29,42
	2 мин	30,70	31,72	34,61	32,35	31,30	24,80	22,61	26,24	25,42	14,30	30,88	23,54
	5 мин	33,99	25,14	30,14	29,76	25,65	15,19	21,56	20,80	25,71	21,01	29,80	25,51

Заключение. Разработанный программно-аппаратный комплекс открывает широкие возможности для анализа водных сред. Ранняя диагностика возможных негативных последствий позволяет принимать решения о необходимых мерах поддержки задолго до наступления критических изменений в экосистемах. Ранжирование ответных реакций микроорганизмов на воздействие различных групп загрязняющих веществ даёт возможность внедрять систему классификации, которая позволит значительно повысить экспрессность анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Баширова Р.М, Максимов Г.Г., Ахметова Л.А.* Основы экотоксикологии: учебное пособие. Уфа: РИЦ БашГУ, 2009. 120 с.

2. *Скибенко В.В.* Следовый метод и аппаратура для определения параметров подвижности микроорганизмов в процессе культивирования: Дисс. канд. тех. наук (спец. 03.00.23). Москва, 1983. 161 с.

3. *Котов Н.В.* Роль электрических процессов в организации двигательной активности Paramecium caudatum: Дисс. канд. биол. наук. (спец. 03.00.02). Казань. 1984. 196 с.

4. *Ковалевская А.С., Смолова О.В.* Метод классификации токсикантов на основе выявления характеристик этологических реакций инфузорий // Известия ЮФУ. Технические науки. 2010. № 9. С. 126–130

5. *Куликов, В.Г., Евстратов В.С.* Теория алгоритмов: учебно-методическое пособие. Москва: МИСИ МГСУ, 2022. 43 с. Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. URL: https://e.lanbook.com/book/262283 (дата обращения: 27.10.2022). Режим доступа: для авториз. пользователей.

6. *Котов Н.В.* Двигательная активность Paramecium caudatum: Дисс. док. физ.-мат. наук (спец. 03.00.02). Казань. 2001. 255 с.

7. *Трошина, Г. В.* Численные расчеты в среде MatLab: учебное пособие Новосибирск: НГТУ, 2020. 72 с. Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. URL: https://e.lanbook.com/book/152243 (дата обращения: 01.11.2022). Режим доступа: для авториз. пользователей.

8. *БубновА.Г., БуймоваС.А.,Гущин А.А., Извекова Т.В.* Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды: учебно-методическое пособие. Иваново: ИГХТУ, 2007. 112 с.

SOFTWARE AND HARDWARE COMPLEX FOR STUDYING TOXICITY OF AQUATIC ENVIRONMENTS BASED ON THE EVALUATION OF MOTION ACTIVITY PARAMETERS OF *P. CAUDATUM*

O.V. Smolova, A.S. Kovalevskaya, M.I. Semenova, A.V. Smirnov

St. Petersburg State Electrotechnical University "LETI",
RF, St.Petersburg, Professor Popov St., 5

This article discusses the implementation of a software and hardware complex for analyzing the motion activity of *P. Caudatum* ciliates. Paramecia respond to the impact of toxic substances, first of all, by a change in the motion activity. An analysis of motion parameters, such as the length of the free path, the angle and frequency of turns, and the speed of motion, allow us to conclude whether there is toxicity in the tested sample. In addition, taking into account the fact that *P. Caudatum* exhibits different types of motion activity depending on the active substance, it is possible to introduce coefficients that, with a certain degree of probability, signal the presence of a particular substance in the sample. The created software and hardware complex allows automated analysis of the motion activity process and serves as a basis for serial experiments.
Keywords: biotesting, toxicity, motion trajectory, software package, heavy metals, *P. Caudatum.*

REFERENCES

1. *Bashirova R.M, Maksimov G.G., and Ahmetova L.A.* Osnovy jekotoksikologii (Fundamentals of ecotoxicology), Ufa: RIC BashGU, 2009, 120 p.
2. *Skibenko V.V.* Sledovyj metod i apparatura dlja opredelenija parametrov podvizhnosti mikroorganizmov v processe kul'tivirovanija: Diss. kand. teh. nauk (Trace method and apparatus for determining the parameters of the mobility of microorganisms in the process of cultivation. Cand. eng. sci. thesis), Moscow, 1983, 161 p.
3. *Kotov N.V.* Rol' jelektricheskih processov v organizacii dvigatel'noj aktivnosti Paramecium caudatum: Diss. ... kand. biol. nauk (The role of electrical processes in the organization of motor activity Paramecium caudatum. Cand. biol. sci. thesis) Kazan', 1984, 196 p.
4. *Kovalevskaja A.S. and Smolova O.V.* Metod klassifikacii toksikantov na osnove vyjavlenija harakteristik jetologicheskih reakcij infuzorij (Method for the classification of toxicants based on the identification of characteristics of ethological reactions of ciliates), Izvestija JuFU, Tehnicheskie nauki, 2010. No. 9, pp. 126–130.
5. *Kulikov V.G. and V.S. Evstratov* Teorija algoritmov (Theory of Algorithms) Moscow, MISI MGSU, 2022, 43 p.
6. *Kotov N.V.* Dvigatel'naja aktivnost' Paramecium caudatum: Diss. ... dok. fiz.-mat. nauk (Motor activity Paramecium caudatum. Doc. phys.-math. sci. thesis), Kazan', 2001, 255 p.
7. *Troshina, G. V.* Chislennye raschety v srede MatLab (Numerical calculations in the MatLab environment), Novosibirsk: NGTU, 2020, 72 p.
8. *Bubnov A.G., Bujmova S.A., Gushhin A.A., Izvekova T.V.* Biotestovyj analiz – integral'nyj metod ocenki kachestva ob#ektov okruzhajushhej sredy (Bioassay analysis – an integral method for assessing the quality of environmental objects). Ivanovo: Ivan. gos. him.-tehnol. un-t., 2007, 112 p.