Институт проблем экологии и недропользования
Академии наук Республики Татарстан

Организация Объединенных Наций
по вопросам образования, науки и культуры

United Nations Educational, Scientific
and Cultural Organization





Кафедра ЮНЕСКО
Развитие фундаментальных принципов Хартии
Земли для создания устойчивого сообщества

UNESCO chair
on the Application of the fundamental principles of
the Earth Charter to create a sustainable community

Сборник научных трудов молодых ученых

Казань
«Отечество»
2014

УДК 502.1(06)+574(06
ББК 20.1я431+28.081я431
И 71

Редакционная коллегия:
Доктор химических наук Р.Р. Шагидуллин
Доктор химических наук В.З. Латыпова
Доктор биологических наук В.А. Яковлев
Кандидат биологических наук Д.В. Иванов (ответственный редактор)
Кандидат биологических наук М.Ш. Сибгатуллина

Рецензенты:
Доктор геолого-минералогических наук Б.В. Успенский
Доктор технических наук А.С. Сироткин
Доктор химических наук Ю.А. Тунакова
Доктор юридических наук Р.Н. Салиева

И 71 **Сборник** научных трудов молодых ученых (по материалам I Республиканской молодежной экологической конференции, г. Казань, 10-11 апреля 2014 г.). – Казань: Отечество, 2014. – 328 с.

ISBN 978-5-9222-0858-1

Сборник научных трудов молодых ученых, составленный по материалам I Республиканской молодежной экологической конференции, проведенной в Институте проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан 10–11 апреля 2014 г., включает статьи, в которых обсуждается широкий спектр современных проблем экологии, охраны окружающей среды, геологии и рационального недропользования, а также правового регулирования рационального природопользования.

Для специалистов в области экологии, природопользования и природоресурсного права.

ISBN 978-5-9222-0858-1

© Институт проблем экологии и недропользования АН РТ

УДК 504.064.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПО ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ DAPHNIA MAGNA ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ

Тимирбаева О.Ю.[1], учащаяся

Амирянова Г.Ф.[2], студент

Никитин О.В.[2], к.г.н., доцент

E-mail: Oleg.Nikitin@kpfu.ru

[1]Центр образования №178, МБОУ ДОД «Центр детского творчества «Танкодром» Советского района г. Казани», г. Казань

[2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань

Аннотация

Разработана новая оперативная (30 мин) методика определения интегральной токсичности водной среды по изменению поведенческой активности дафний при помощи программно-аппаратного комплекса «TrackTox», реализующего алгоритмы компьютерного зрения. Стоимость разработки ниже имеющихся аналогов на рынке. Предложенный подход можно использовать для оперативной оценки токсичности и экологического риска, как для человека, так и для водных экосистем.

Ключевые слова: компьютерное зрение, оценка токсичности, скорость плавания, дафния.

Введение

Загрязнение водной среды является одной из наиболее актуальных экологических проблем. Для оценки степени антропогенного воздействия на водные экосистемы наряду с методами химического анализа активно используют биотестирование как интегральный показатель токсического загрязнения среды (Моисеенко, 2005; Филенко, 2007). Это связано с тем, что химический анализ во многих случаях не позволяет оценить истинную опасность поступления тех или иных загрязнителей в среду обитания, спрогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. Разнообразные загрязняющие вещества, попадая в воду, могут претерпевать в ней различные трансформации, зачастую усиливая при этом свое

токсическое действие. Кроме того, из-за множественности прямых и обратных связей оценить воздействие всей совокупности токсикантов не представляется возможным. По этой причине применяются методы интегральной оценки качества воды, основным из которых является биотестирование. Среди методов биотестирования важное место занимает определение токсичности среды с использованием низших ракообразных и в первую очередь *Daphnia magna* Stratus, 1820. Методы биотестирования на дафниях широко применяются для целей экологического контроля, как в России, так и за рубежом (Жмур, 2001; ISO, 2001; US EPA, 2002).

Популярность дафний связана главным образом с тем, что она без особых трудностей выращивается в лабораторных условиях, довольно устойчива при культивировании, имеет короткий жизненный цикл, позволяющий отслеживать последствия токсического воздействия (даже в малых концентрациях) на протяжении ряда поколений. В качестве тест-реакции в анализе на острую токсичность в этом случае преимущественно используют смертность рачков, а при установлении хронического токсического воздействия проводят наблюдения за изменением плодовитости и качеством потомства. Перечень вышеназванных реакций можно существенно расширить, если использовать дополнительные сведения по тест-объекту, основанные на его функциональных показателях, в том числе и поведенческие реакции. Это позволило бы проводить оценку качества водной среды более оперативно и отслеживать более низкие концентрации токсикантов. Однако, в связи с трудностью их регистрации, применение их в настоящее время ограничено, либо имеющиеся методы чрезвычайно дороги.

На современном этапе развития техники возможно сверхчувствительное определение наличия токсических веществ в воде по поведенческим характеристикам тест-объектов, посредством компьютерного анализа их цифровых изображений. В некоторых случаях этот подход используется на практике для построения биологических систем раннего оповещения о наличии в среде токсических веществ. В качестве индикаторов преимущественно используют рыб и ракообразных. В частности, в системе «DaphniaToximeter» (bbeMoldanke, Швентиненталь, Германия) в непрерывно проточной камере (0.5-2 л/ч) осуществляется наблюдение за плавательной активностью дафний (до 12 шт.), контролируются такие параметры как:

средняя скорость, расстояние между дафниями, их размер. Регистрация ухудшения качества воды осуществляется довольно оперативно (Baea, Park, 2014).

К недостаткам метода можно отнести невозможность обработки пересечений дафний в пространстве при плавании, т.е. слежение за отдельными тест-организмами не осуществляется (производится усредненная оценка). Кроме того, в тесте используется лишь профильтрованная вода, тогда как Европейская водная рамочная директива рекомендует использовать нефильтрованную воду для процедуры тестирования, т.к. при фильтрации могут быть удалены адсорбированные на взвешенных частицах токсичные вещества.

Цель данной работы – разработать методику определения токсичности водной среды по изменению поведенческой активности дафний при помощи системы компьютерного зрения.

При этом ставились следующие задачи:

1. Разработать методику определения токсичности водной среды по изменению поведенческой активности дафний и создать прототип прибора, обеспечивающего стандартизацию проведения процедуры биотестирования при помощи технологии компьютерного зрения.

2. Определить параметры токсичности для модельного (эталонного) токсиканта при помощи стандартных методов биотестирования и при помощи разработанной методики биотестирования по поведенческой активности дафний.

3. Оценить токсичность природного токсиканта – цианотоксинов, выделяемых при массовом развитии синезеленых водорослей, по плавательной активности дафний.

Материал и методы исследований

Разработка методики определения токсичности водной среды по изменению поведенческой активности дафний при помощи технологии компьютерного зрения, а также ее сравнение с основными методиками приборного биотестирования, используемыми в настоящее время для экотоксикологического контроля в Российской Федерации осуществлялось на базе кафедры прикладной экологии Института экологии и географии КФУ в период с сентября по декабрь 2013 г. Описание этапов разработанной процедуры биотестирования и используемое для этого оборудование приводится далее.

Для сравнения были использованы четыре методики биотестирования, широко используемые в лабораторной практике в России:

1. Методика определения интегральной токсичности по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04, Т 16.1:2.3:3.8-04 (2010). Биолюминесценция микроорганизмов регистрировалась на приборе «Биотокс-10М» (НЕРА-С, Москва, Россия).

2. Методика определения токсичности по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorellavulgaris* Beijer), ПНД Ф Т 14.1:2:4.10-2004, Т 16.1:2.3:3.7-2004 (2012). Культуру водоросли выращивали на питательной среде Тамия с использованием культиватора «КВ-05», для экспозиции культуры с токсикантом применялся многокюветный культиватор «КВМ-05», для регистрации оптической плотности (пропорциональной численности хлореллы) – измеритель «ИПС-03» (Энерголаб, Москва, Россия).

3. Методика определения токсичности по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorellavulgaris* Beijer), ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09, Т 16.1:2.3:3.14-09 (2012). Помимо оборудования указанного в предыдущей методике, для регистрации флуоресценции использовался флуориметр «Фотон-10» (Энерголаб, Москва, Россия).

4. Методика определения острой токсичности по смертности дафний (*Daphnia magna* Straus), ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, Т 16.1:2.3:3.9-06 (2011). Биотестирование осуществлялось в климатостате «В-4» (освещение лампами дневного света 1200-2500 лк, фотопериод 12+12 часов и температура 20±1 °С), с использованием устройств для экспонирования рачков «УЭР-03» (Энерголаб, Москва, Россия).

В качестве модельного токсиканта использовался бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) – вещество, стандартно применяемое для оценки уровня физиологической активности лабораторных культур и выборок тест-объектов. Из токсиканта готовилась серия разбавлений, минимальная исследуемая концентрация – 0.5 мг/л. В каждом биотесте каждая концентрация исследовалась в повторностях, как в контрольных, так и в опытных образцах (N=15).

Результаты биотестирования представлены в виде индекса токсичности (A, %):

$$A, \% = 100 * \frac{(X_к - X_{оп})}{X_к}$$

где $X_к$ и $X_{оп}$ – полученные значения тест-функции в контроле и опыте соответственно. Поскольку в различных методах биотестирования критерии токсичности отличаются, для их сравнения находился индекс токсичности для минимальной исследуемой концентрации (0.5 мг/л), а также по уравнению регрессии вычислялась концентрация токсиканта, которая будет соответствовать критерию токсичности по рассматриваемым методикам (20, 25 и 50%), а также потенциально неопасный уровень токсичности в 10%.

Для анализа возможного токсического эффекта на поведенческую активность дафний цианотоксинов, готовился раствор с использованием стандарта известной концентрации из коммерческой ИФА тест-системы «Microcystins/Nodularins (ADDA), ELISAKit, PN 520011» (Abraxis, Уорминстер, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 8.0» (StatSoft, Талса, США).

Результаты исследований

На первом этапе исследований были проработаны и определены оптимальные параметры методики и последовательность шагов определения токсичности водной среды по изменению поведенческой активности дафний (рис.1), а также создан прототип прибора, обеспечивающего унификацию и стандартизацию проведения процедуры биотестирования.

Для обнаружения и регистрации поведенческих реакций дафний использовался подход, основанный на компьютерном зрении. Метод построен на покадровом компьютерном анализе потоковой видеопоследовательности изображений, на которых присутствует тест-объект. Возможно использование как ранее записанных видеофайлов, так и обработка в режиме реального времени. В данной работе анализ выполнялся при помощи специализированной программы трекинга тест-объектов «TrackTox» (Никитин, Латыпова, 2013).

В работе использовалась лабораторная монокультура *Daphnia magna*, выращиваемая в климатостате «В-4» (по ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, Т 16.1:2.3:3.9-06). Для определения параметров поведенческой активности, единичные дафнии помещались в пластиковый контейнер (9.8х0.9х4 см, V=25 мл), заполненный культивационной водой из климатостата, который в свою очередь помещался в созданный прототип прибора для трекинга тест-объекта.

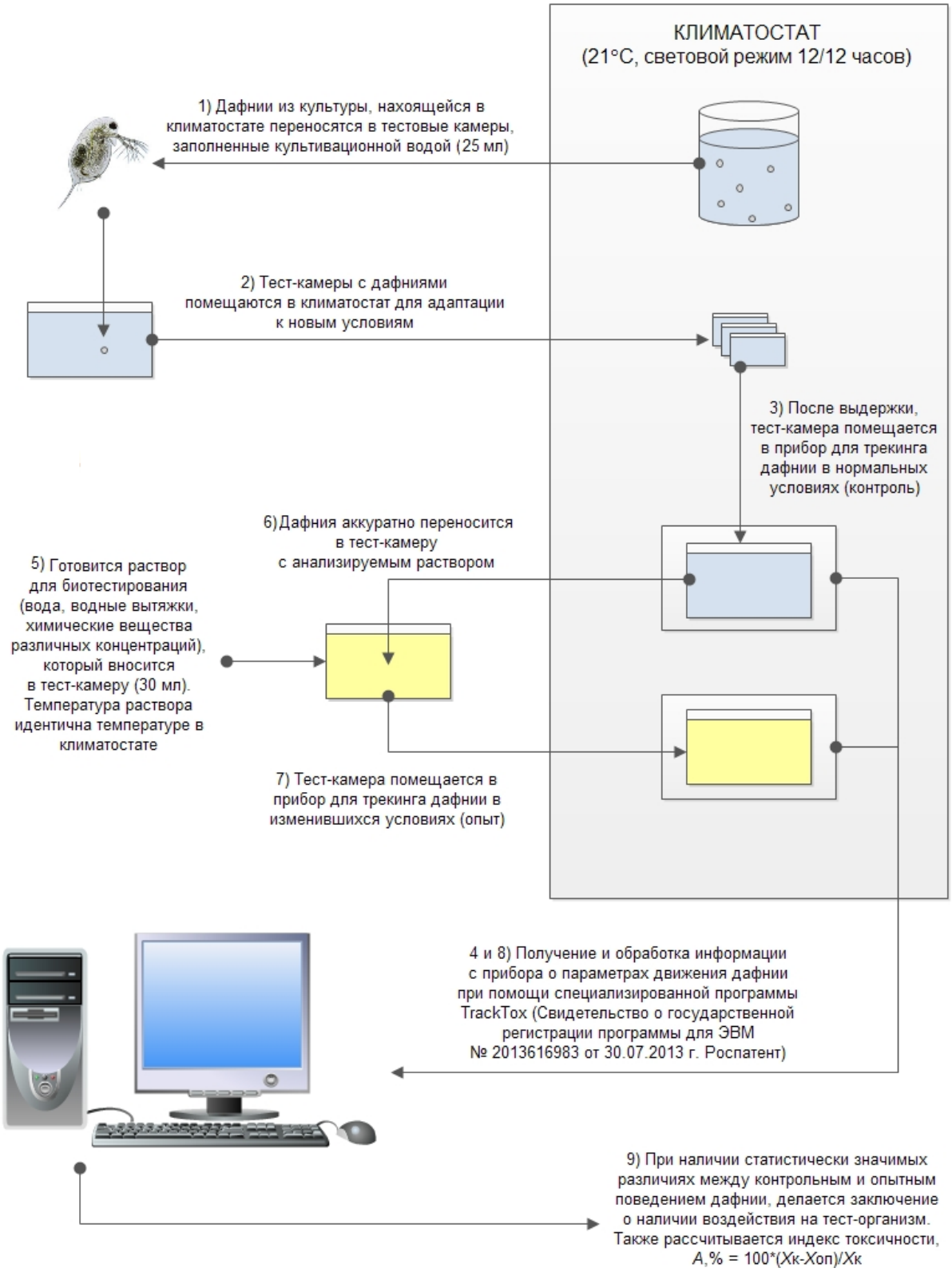


Рис. 1. Общий алгоритм определения токсичности по созданной методике

Полученные при помощи прибора видеоматериалы обрабатывались программой «TrackTox», с выводом результатов в табличный файл, доступный для последующей статистической обработки. В табличном виде представлена следующая информация: текущая позиция в видеофайле; координаты тест-объекта и его

ориентация в пространстве; последнее и общее пройденное расстояние; средняя длина сегмента пути; затраченное время на расстояние и скорость плавания.

Критерием наличия реакции на появление токсиканта считалось наличие статистически значимого различия между выборками контрольных образцов и образцов с добавлением токсиканта (при 30 минутной экспозиции). Различия между контрольными и опытными выборками устанавливали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни (*P*=0.05), данный непараметрический критерий был выбран по причине того, что распределение скоростей плавания дафний не подчинялось нормальному распределению (предварительно был выполнен графический анализ и анализ по критерию Колмогорова-Смирнова).

Проведенные исследования по оценке токсичности модельного токсиканта показали, что в целом все тесты реагируют схожим образом. Индекс токсичности для минимальной концентрации (0.5 мг/л) составлял 4-6.0%, концентрация токсиканта соответствующая границе токсичности по методикам – 2.2-6.2 мг/л. Можно отметить, что несколько большую чувствительность к бихромату калия имеет тест по смертности дафний, наименее чувствительным оказался водорослевый тест (табл. 1), бактериальный тест «Эколюм» занимает промежуточное положение, но по нему можно установить токсичность наиболее оперативно (30 мин).

Таблица 1. Параметры токсичности для модельного токсиканта в стандартных биотестах

	Тест-объект			
	Эколюм	Хлорелла	Хлорелла	Дафнии
Тест-функция	био-люминесценция	оптическая плотность	флуоресценция	смертность
Время экспозиции	30 мин	22 часа	1 час	48 часов
A, %, для *C* = 0,5 мг/л	5	4	4	6
C, мг/л для *A* = 10%*	1.2	1.3	1.1	0.3
C, мг/л для *A* = 20%*	**2.4**	**2.6**	4.5	0.8
C, мг/л для *A* = 25%*	3.0	3.3	**6.2**	1.0
C, мг/л для *A* = 50%*	6.2	6.8	14.7	**2.2**

* – расчетные величины; жирным выделены концентрации для индекса токсичности, определяющего границу токсичности (токсично/не токсично) по методике.

Во всех рассмотренных биотестах расчет индекса токсичности производится на основании средних величин, однако методиками не предусмотрена процедура проверки получаемых данных на анализ распределения (априори предполагается, что распределение нормальное).

Сводные данные по оценке токсичности бихромата калия по поведенческой активности дафний приведены в таблице 2, активность в течение экспозиции – на рисунке 2. По разработанной методике была оценена минимальная концентрация (0.5 мг/л).

Таблица 2 Плавательная активность дафний в контроле и в эксперименте с модельнымтоксикантом (0.5 мг/л) при экспозиции 30 мин

	Средняя скорость плавания, см/с	N	Стандартная ошибка среднего	Медианная скорость плавания, см/с
Контроль	0.55	9004	0.004	0.46
С токсикантом	0.56	8993	0.004	0.51
A, %	2			11

Из полученных данных видно, что, несмотря на визуальное сходство данных при экспозиции, интегрально в эксперименте с модельным токсикантом наблюдается гиперактивность дафний по сравнению с контролем. Рассчитанный индекс токсичности (2%), в целом аналогичен реакции в стандартных биотестах.

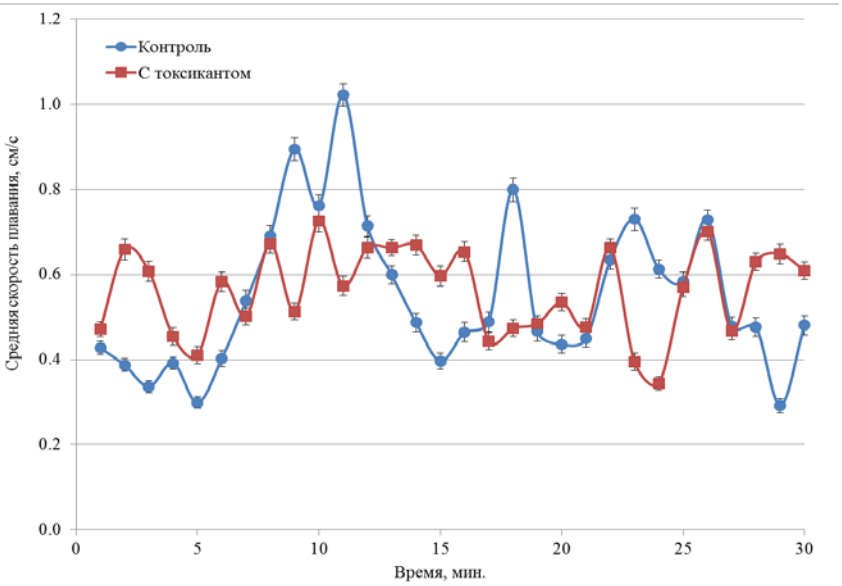


Рис. 2. Плавательная активность дафний в контроле и в эксперименте с модельным токсикантом (0.5 мг/л) при экспозиции 30 мин

Однако если вместо средней скорости плавания дафний использовать медианную скорость, то значение индекса токсичности изменится более чем в 4.5 раза (11%). Последнее представляется более подходящим подходом для оценки токсичности, т.к. для переменных, не имеющих нормального распределения, среднее арифметическое не является корректной оценкой. В этом случае, чувствительность нового метода будет выше, чем у рассмотренных подходов биотестирования, при сохранении высокой оперативности анализа. Это в свою очередь позволяет более точно производить оценку экологического риска токсиканта.

Найденные значения индекса токсичности не достаточны для заключения о наличии токсического эффекта в соответствии с критериями рассмотренных стандартных методик. Тем не менее, большой объем выборки, как для контроля, так и для эксперимента ($N \sim 9000$) позволяет установить наличие статистически значимых различий в плавательной активности дафний между ними по U-критерию Манна-Уитни ($P<0.001$).

В эксперименте с определением токсичности цианотоксинов по плавательной активности дафний исследовалась концентрация микроцистинов на уровне 0.16 мкг/л. Данный уровень был выбран по причине того, что это минимальная концентрация, которую возможно определить при помощи иммуноферментного анализа (ИФА наиболее часто применяется для экспресс-диагностики цианотоксинов в природных водах). Норматив ВОЗ для микроцистинов – 1 мкг/л, концентрация в природных водах РТ – до 27 мкг/л (Никитин и др., 2012). Сводные данные по оценке токсичности микроцистинов по поведенческой активности дафний приведены в таблице 3, активность в течение экспозиции – на рисунке 3.

Таблица 3. Плавательная активность дафний в контроле и в эксперименте смикроцистинами (0.16 мкг/л) при экспозиции 30 мин

	Средняя скорость плавания, см/с	N	Стандартная ошибка среднего	Медианная скорость плавания, см/с
Контроль	0.41	8832	0.004	0.32
С токсикантом	0.87	8653	0.006	0.78
А, %	112			144

При внесении токсиканта плавательная активность резко возрастает на протяжении первых 10 мин и остается на высоком уровне до конца эксперимента (в среднем в 2 раза выше, чем в контроле). В данном случае именно гиперактивность является ответом на наличие в среде токсиканта (вещества ингибирующие мышечную и нервную активность не рассматривались). Рассчитанный индекс токсичности (112% по средней скорости и 144% по медианной скорости) указывает на высокую токсичность вещества. Выраженная гиперактивность, оцененная по индексу токсичности, подтверждается и наличием статистически значимых различий между контролем и опытом по *U*-критерия Манна-Уитни ($P<0.001$).

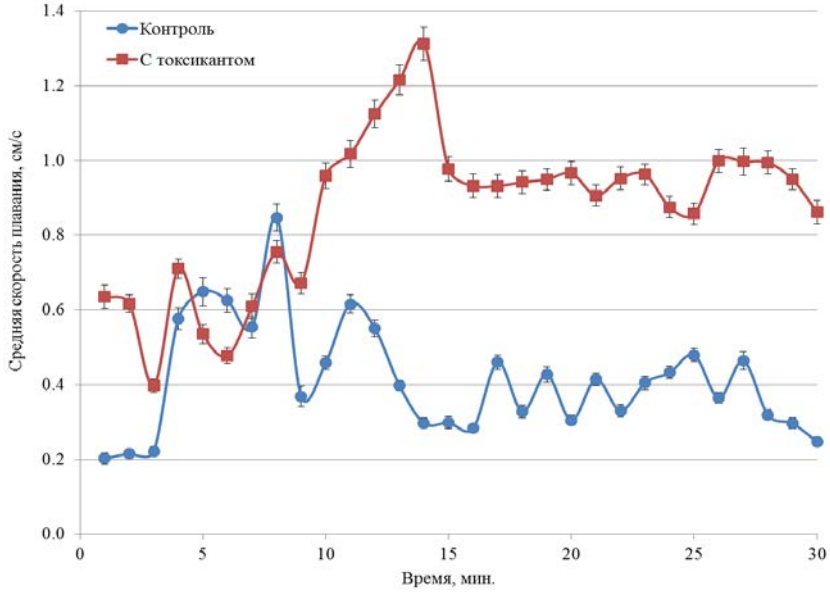


Рис. 3. Плавательная активность дафний в контроле и в эксперименте смикроцистинами (0.16 мкг/л) при экспозиции 30 мин

Высокая чувствительность метода, в совокупности с высокой оперативностью позволяет говорить о том, что в дальнейшем, можно модифицировать предложенный подход оценки токсичности для осуществления биологического контроля качества вод в проточных условиях в режиме реального времени, для контроля качества очистки забираемых и возвращаемых сточных вод на «водоканалах» городов, а также очистных сооружений промышленных предприятий. Кроме того, предложенный подход можно использовать для более оперативной оценки экологического риска, как для человека, так и для водных экосистем.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Разработана новая оперативная (30-60 мин) методика определения токсичности воды по изменению поведенческой активности дафний (скорости плавания) при помощи технологии компьютерного зрения, а также создан прототип прибора, обеспечивающего стандартизацию проведения процедуры биотестирования.

2. Токсичность модельного токсиканта в целом идентична при оценивании стандартными методами биотестирования (*A*,% = 4-6%) и при помощи разработанного метода по поведенческой активности дафний (*A*,% = 11%). Рекомендуется для расчета индекса токсичности использовать медианную скорость плавания дафний.

3. По разработанной методике обнаружена высокая токсичность природного токсиканта – микроцистинов (*A*,% = 144%). Токсичность выявлена при концентрации 0.16 мкг/л, что соответствует пределу обнаружения методом ИФА.

Список литературы

1. Жмур Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.: Акварос, 2001. 47 с.

2. Моисеенко Т.И. Экотоксикологический подход к оценке качества вод // Водные ресурсы. 2005. Т. 32, №2. С. 184-195.

3. Никитин О.В., Латыпова В.З. Программа трекинга тест-объектов в токсикологических экспериментах «TrackTox». Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2013616983 от 30.07.2013 г. (Роспатент).

4. Никитин О.В., Степанова Н.Ю., Мукминов М.Н., Латыпова В.З. Индикация цианотоксинов в природных водах Республики Татарстан // Ученые записки КГАВМ. 2012. Т. 212. С. 341-344.

5. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды // Экологические системы и приборы. 2007. № 6. С. 18-20.

6. ISO. Water quality determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — chronic toxicity test. ISO 10706:2000 (E). Geneva, Switzerland: International organization for standardization, 2001.

7. Baea M.-J., Park Y.-S. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review // Science of the Total Environment. 2014. V. 466-467. P. 635-649.

8. US EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012-U.S.USA, Environmental Protection Agency, 2002.