

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН



РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ



ДЕПАРТАМЕНТ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ
ЯРОСЛАВСКОЙ ОБЛАСТИ

АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА ВОДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ И ЭКОСИСТЕМЫ

МАТЕРИАЛЫ

V ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ВОДНОЙ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ,
ПОСВЯЩЕННОЙ ПАМЯТИ Б.А. ФЛЕРОВА

И

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

МАТЕРИАЛЫ

ШКОЛЫ-СЕМИНАРА ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ, АСПИРАНТОВ И СТУДЕНТОВ

Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.

ТОМ 2

УДК 504.4.064(063)
ББК28.082
А-72

Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы: материалы V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, с приглашением специалистов из стран ближнего зарубежья; Современные методы исследования состояния поверхностных вод в условиях антропогенной нагрузки: материалы школы-семинара для молодых ученых, аспирантов и студентов. (Борок, 28 октября - 1 ноября 2014 г.). В двух томах. Том 2.– Ярославль: Филигрань, 2014. – 204 с.

ISBN 978-5-906682-13-0

Сборник материалов опубликован при финансовой поддержке:
Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 14-04-20214-г)
Федерального агентства научных организаций России
Департамента охраны окружающей среды и природопользования Ярославской области

В книге опубликованы материалы докладов конференции и школы–семинара по широкому кругу теоретических и практических вопросов водной экотоксикологии и охраны окружающей среды.

В части 2 материалов рассматриваются биохимические, физиологические, поведенческие реакции гидробионтов на действие антропогенных факторов; приведены тексты и конспекты, прочитанных лекций.

Для широкого круга специалистов: токсикологов, гидробиологов, экологов, гидрохимиков, ихтиологов, зоологов, альгологов, гидроботаников.

Материалы печатаются в авторской редакции

Компьютерная верстка: И.В. Чалова, Е.А. Заботкина

Фото на обложке:
на лицевой – нерестовый ход лососевых рыб на одной из рек п-ва Камчатка, автор А.В. Улатов, 2014 г.;
на обороте – замор рыбы в результате сброса сточных вод на р.Лухта, Грязовецкий район, Вологодская область, автор Г.М. Чуйко, лето 2009 г.

ISBN 978-5-906682-13-0 © Институт биологии внутренних вод РАН, 2014

отловленных в реке Акстафачай, в отличие от характера его изменений в печени и жабрах у этих рыб, не различалось от его уровня у рыб из незагрязнённых рек. С другой стороны, за исключением рыб, выловленных в реке Акстафачай (небольшое снижение), уровень цитохрома Р-450 в головном мозге рыб из всех исследованных рек не отличался от его уровня у рыб из незагрязнённой реки Худат. Эти результаты, по-видимому, указывают на активное участие структур головного мозга в регуляции процессов адаптации к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды.

Список литературы

1. Sharp F.R., Massa S.M., Swanson R.A. Heat-shock protein protection.//Trends Neurosci., 1999, V. 22, № 3, p. 97-99.
2. Мехтиев А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами.//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 129. № 8. С. 147–150.
3. Мамедова Г.М. Отчёт лаборатории геохимического режима и мониторинга загрязнения природных вод Азербайджанской Республики на февраль 2012 г. В кн.: М.А.Мамедов. Гидрография Азербайджана. Баку, Эльм. 2012. с. 52-59, 253 с.
4. Мехтиев А.А., Мовсум-заде С.К. Антимутагенная активность серотонинергической системы и подлежащие механизмы у молоди осетров (*Acipenser gueldenstaedti persicus*) и серебряных карасей (*Carassius auratus*).// Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2008. Т. 44. № 5. С. 476–481.
5. Мехтиев А.А., Палатников Г.М., Мовсум-заде С.К., Касимов Р.Ю. Возрастание уровня мутаций в тканях бычков и молоди осетров в условиях блокады антителами серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка.// Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2010. Т. 46. № 5. С. 375–379.
6. Н.Дж.Мустафаев, А.А.Мехтиев. Адаптивное повышение уровня серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка в тканях пролупроходных и проходных рыб при повышении солёности воды.// Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2013, т. 49, № 6, с. 443-448.

УДК 574.64+57.084+57.087

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПО ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *DAPHNIA MAGNA* ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ «TRACKTOX»

О.В. Никитин, В.З. Латыпова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Институт экологии и природопользования
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, Россия, Oleg.Nikitin@kpfu.ru

В работе представлены данные по определению токсичности водной среды, содержащей микроцистин-LR, по плавательной активности *Daphnia magna*. Активность определялась при помощи новой системы компьютерного зрения «TrackTox».

Ключевые слова: *Daphnia*, скорость плавания, цианотоксины, оценка токсичности.

Загрязнение водной среды является одной из наиболее актуальных экологических проблем. Для оценки степени воздействия на водные экосистемы наряду с методами химического анализа активно используют биотестирование, как интегральный показатель токсического загрязнения среды [1, 2]. Это связано с тем, что химический анализ во многих случаях не позволяет оценить истинную опасность поступления загрязнителей, спрогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. По этой причине применяются методы интегральной оценки качества воды, основным из которых является биотестирование. Среди методов биотестирования важное место занимает определение токсичности с использованием низших ракообразных и в первую очередь с использованием *Daphnia magna* Stratus, 1820. Методы биотестирования на дафниях широко применяются для целей экологического контроля, как в России, так и за рубежом, в том числе и с закреплением обязательности их использования на законодательном уровне [3, 4].

В качестве тест-реакции преимущественно используют смертность рачков, а при установлении хронического токсического воздействия проводят наблюдения за изменением плодовитости и качеством потомства. Перечень 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.

На современном этапе развития техники возможно чувствительное определение наличия токсических веществ в воде по поведенческим характеристикам тест-объектов, посредством компьютерного анализа их цифровых изображений. Первые работы, связанные с оценкой токсичности среды подобными методами появились в конце 90-х годов XX в. (например, по дафниям – 1998 г., по флагеллятам – 1999, 2000 гг.). В частности, в экспериментах с дафниями предполагалась экспозиция тест-объектов в токсичной среде (около суток) и сравнение полученных данных по скоростям движения с контрольными данными. Из-за низких вычислительных мощностей компьютеров, исследователи ограничивались анализом последовательностей из нескольких десятков изображений.

В некоторых случаях этот подход используется на практике для построения биологических систем раннего оповещения о наличии в среде токсических веществ (biological early warning systems). В качестве биоиндикаторов преимущественно используют рыб и ракообразных. Так, в коммерчески реализуемой системе «Daphnia Toximeter» (bbe Moldaenke, 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 и некоторые другие. Регистрация ухудшения качества воды осуществляется довольно оперативно (www.bbe-moldaenke.de). 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 [5]. Также существенным недостатком является высокая стоимость системы «Daphnia Toximeter», которая в базовой комплектации составляет около 3,1 млн. руб. (65 тыс. евро). Решить ряд недостатков системы «Daphnia Toximeter» предлагается с помощью шестиканальной системы слежения за индивидуальными дафниями – «Grid Counter» [6]. Существуют и некоторые другие реализации. В России производится приборный комплекс использующий алгоритмы компьютерного зрения для оценки токсичности по инфузориям – «БиоЛаТ» (www.energolab-bio.ru). На основании анализа последовательности пар изображений, определяется количество тест-объектов и их смещение, на основании чего делается заключение об их жизнеспособности. Таким образом, неугасающий интерес к использованию технологий компьютерного зрения в экотоксикологии, показывает перспективность данного метода для оценки токсичности.

На кафедре прикладной экологии Института экологии и природопользования КФУ разработан программно-аппаратный комплекс для обнаружения и регистрации поведенческих реакций тест-объектов – «Анализатор токсичности «TrackTox» (рис. 1), реализующий алгоритмы компьютерного зрения. В частности таких алгоритмов как: получения видео с тест-объектами, применения фильтров для устранения «шумов», конвертации цветовой модели, определения граничных значений для пороговой обработки видео, получения бинарного видеопотока, его покадровой обработки с целью нахождения контуров объектов и определения центров их масс, расчета координат объектов, осуществление трекинга объектов и его визуализация на исходном видео.

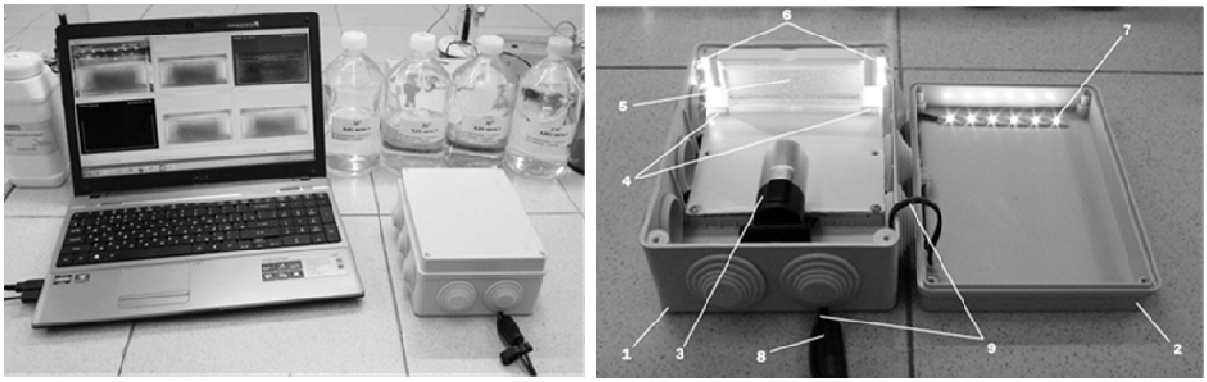


Рис. 1. Внешний вид и устройство прототипа программно-аппаратного комплекса «Анализатор токсичности «TrackTox». 1) корпус прибора; 2) крышка; 3) видеокамера; 4) фиксаторы тестовой камеры; 5) тестовая камера; 6) боковые светодиодные осветители (опционально); 7) верхние светодиодные осветители; 8) USB-кабель передачи видеосигнала на компьютер; 9) кабель электропитания

Аппаратная часть комплекса состоит из герметичного контейнера с фиксаторами для установки тестовой камеры с тест-организмами (объемом до 30 мл). Внутренняя часть контейнера освещается при помощи светодиодной подсветки (2500 лк). Фронтальная видеокамера (с КМОП-матрицей) обеспечивает регистрацию поведения тест-организма (рекомендуемое разрешение 640x360 пикселей, возможная частота записи – до 30 кадров/с). Электропитание может осуществляться как от сети (220 В), так и от аккумуляторных батарей, что обеспечивает портативность прибора.

Обработка и анализ получаемых данных производится управляющей станцией, состоящей из подключаемой ЭВМ и программы трекинга тест-объектов «TrackTox» [7]. Метод построен на покадровом компьютерном анализе изображений, на которых присутствует тест-объект. Определяются следующие параметры: текущие координаты в двухмерном пространстве, скорость плавания, высота нахождения тест-объекта в камере, текущее и общее пройденное расстояние, размер тест-объекта и его ориентация в пространстве. Анализатор токсичности «TrackTox» рекомендуется использовать совместно с термостатирующим оборудованием, обеспечивающим стабильные оптимальные температурные условия для дафний (20±2°C, например, термостат «ТСО-1/80 СПУ», климатостат «В4» или эквивалент).

В настоящее время с помощью анализатора токсичности ведутся исследования по изучению поведенческой активности *Daphnia magna* Stratus в нормальных условиях и при добавлении известных концентраций токсикантов. Для экспериментов используется лабораторная монокультура *D. 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 анализа поведенческой активности, в данной работе использовались данные по скорости плавания. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

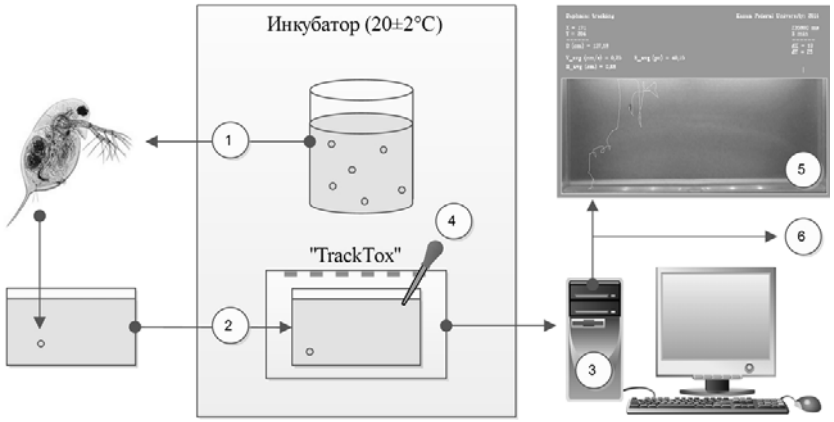


Рис. 2. Схема определения плавательной активности дафний в эксперименте

Единичная дафния при помощи микропипетки быстро и аккуратно переносятся из маточной культуры в прозрачную пластиковую тестовую камеру (100 мм Ч 45 мм Ч 10 мм) с 25 мл культивационной воды (1), далее камера переносится в анализатор токсичности (2), расположенный в термостатируемых условиях (20±2°C). Дафнии выдерживаются 10 мин. в камере для акклиматизации, после чего в течение последующих 20 мин. производится измерение плавательной активности, т.н. «контроль» (3). Для снижения излишней чувствительности, обработка осуществляются с меньшей частотой (5 кадров/с). Для изучения воздействия единичного токсиканта, он помещается в тестовую камеру в количестве, необходимом для достижения нужной концентрации (4). Также возможен вариант реализации эксперимента, когда дафния переносится в другой контейнер с уже подготовленным раствором токсиканта или с пробой воды. После 10 минут экспозиции, в течение 20 мин. снова производится измерение плавательной активности, т.н. «опыт» (3). Таким образом, общее время экспозиции в растворе с токсикантом составляет 30 мин. В ходе всего эксперимента, данные визуализируются на экране (5), а в конце эксперимента данные по плавательной активности дафнии (~6000 измерений в контроле и опыте) передаются в текстовый файл, доступный для последующей обработки и статистического анализа (6).

В данной работе статистическая обработка выполнялась при помощи пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft, Талса, США). Вычислялись средние значения при ежеминутном усреднении (среднее арифметическое, медиана), диапазон разброса данных, интерквартильный размах (IQR), дисперсия, стандартное отклонение (SD), стандартная ошибка среднего (SE). Соответствие данных нормальному распределению проверяли визуально по графику распределения частот скоростей, а также при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Для проверки различий между двумя выборками парных измерений (контроль-опыт) применялся непараметрический Т- критерий Вилкоксона.

Оценку токсичности проводили по изменению (ингибирование или стимулирование) тест-функции – скорости плавания дафний (А, %) по формуле:

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

где $X_к$ и $X_{оп}$ – полученные значения тест-функции в контроле и опыте соответственно.

В качестве примера, по представленной схеме было проведено определение токсичности водной среды, содержащей цианотоксин микроцистин-LR (MC-LR) в концентрации 0.15 мкг/л. Микроцистины – одни из самых известных и широко распространенных цианобактериальных токсинов, выделяемых некоторыми видами цианобактерий при «цветении» водоемов, наиболее активно в результате эвтрофирования. Выбранная концентрация – предел обнаружения микроцистинов многими количественными методами анализа, в частности, такими как ИФА, ВЭЖХ. Раствор был приготовлен с использованием аналитического стандарта MC-LR Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США).

Было обнаружено, что распределение скоростей плавания дафний во всех случаях, как в контрольных, так и с добавлением токсиканта, отличается от нормального, коэффициент асимметрии положителен (пример распределения представлен на рис. 3). Следовательно, для описания данных лучше использовать непараметрические статистики (медиану и т.д.), тем более они более робастны при наличии выбросов, нежели параметрические статистики. Однако стоит заметить, что во многих биологических системах раннего оповещения, построенных на анализе скоростей тест-объектов, используются именно параметрические статистики, без учета закона распределения данных.

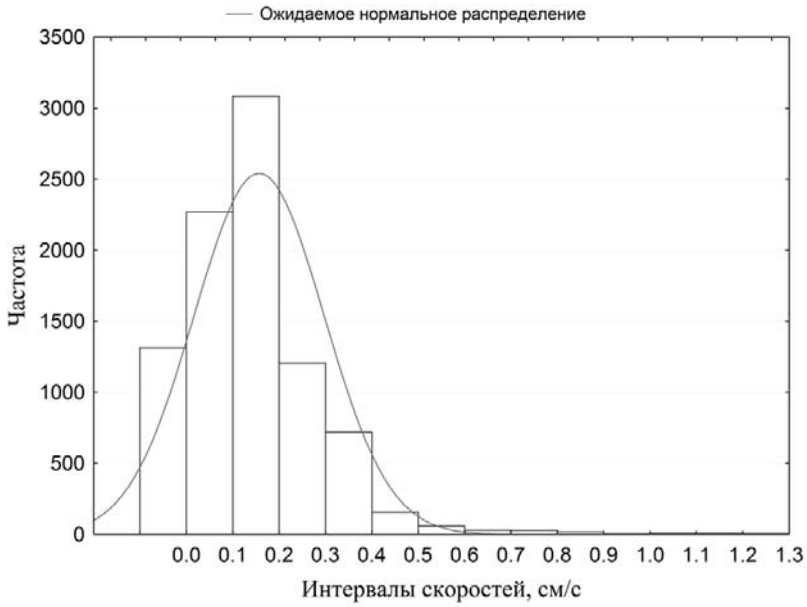


Рис. 3. Частоты распределения скоростей плавания дафний в контрольных условиях в одной из экспериментальных серий

Параметры плавательной активности дафний представлены в таблице. Медианная скорость варьировала от 0.11 до 0.47 см/с в контрольных условиях и от 0.20 до 0.92 см/с после внесения MC-LR. В целом, при добавлении токсиканта групповая медиана скоростей возрастала от 0.29 до 0.37 см/с, медиана изменений тест-функций составила -82%.

Таблица. Параметры плавательной активности дафний в контроле и в эксперименте при добавлении MC-LR в серии из 10 попарных измерений

	N	Медиана	Минимум	Максимум	IQR	Среднее	SD	SE
Контроль	10	0.29	0.11	0.47	0.16	0.25	0.12	0.04
Опыт	10	0.37	0.20	0.92	0.18	0.44	0.27	0.08

В контрольных условиях медианная скорость изменялась слабо, вокруг некой средней величины, при внесении токсиканта происходил ее рост до определенного значения, после чего она сохранялась на данном уровне, при этом разброс данных увеличивался. Пример поведенческой активности дафний в эксперименте представлен на рис. 4.

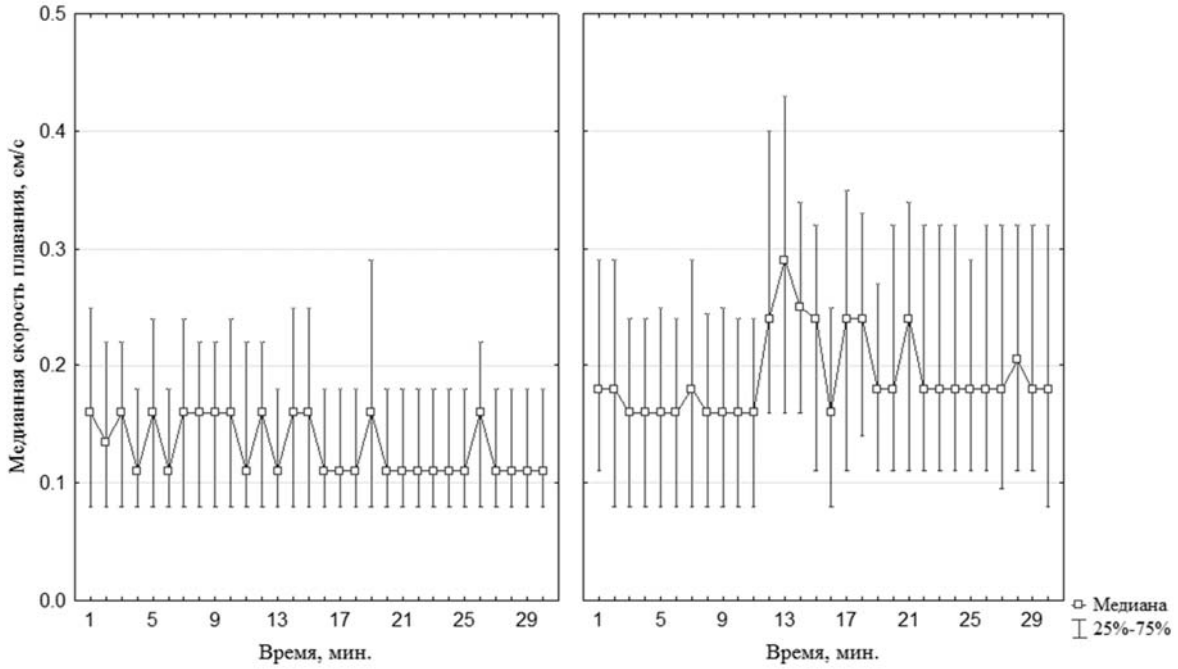


Рис. 4. Одна серия измерений плавательной активности дафний в контроле (слева, N=8927) и эксперименте (справа, N=8142)

Т-критерий Вилкоксона показал наличие статистически значимых различий (T=1.00, Z=2.55, P=0.01) между выборками парных измерений, из чего можно сделать вывод, что добавление MC-LR вызывает увеличение медианной скорости плавания дафний. Это в свою очередь можно использовать в качестве индикатора наличия микроцистинов в водной среде.

Список литературы

1. Blaise C., Fйrard J.-F. Small-scale freshwater toxicity investigations. Vol. 1 – Toxicity test methods. – Springer, 2005. – P. 1–68.
2. Филенко О.Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды // Экологические системы и приборы. – 2007. – N. 6. – С. 18–20.
3. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т. 36. – N. 5. – С. 50–70.
4. US EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-012. – Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2007. – 266 p.
5. 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. – Vol. 466–467. – P. 635-649.
6. Jeon J., Kim J.H., Lee B.C., Kim S.D. Development of a new biomonitoring method to detect the abnormal activity of *Daphnia magna* using automated Grid Counter device // Science of The Total Environment. – 2008. – Vol. 389. – I. 2-3. – P. 545–556.
7. 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.