

На правах рукописи

**Казанцева Анна Геннадьевна**

**МЕТОД И СРЕДСТВА КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД  
ПО ТЕСТ-РЕАКЦИИ ДИНАМИКИ ГАЛЬВАНОТАКСИСА ИНФУЗО-  
РИЙ P.CAUDATUM**

Специальность: 05.11.13 – Приборы и методы контроля  
природной среды, материалов  
и изделий

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2010

Работа выполнена в Санкт-Петербургском государственном электротехническом университете “ЛЭТИ” им. В.И.Ульянова (Ленина)

Научный руководитель –  
кандидат технических наук, доцент Захаров Игорь Сергеевич

Официальные оппоненты:  
доктор технических наук, профессор Брусакова Ирина Александровна  
кандидат технических наук, доцент Алипов Александр Николаевич

Ведущая организация – Санкт-Петербургский государственный технологический университет (технический университет)

Защита диссертации состоится “22” декабря 2010 г. в 16 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.238.09 Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета “ЛЭТИ” имени В. И. Ульянова (Ленина) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 5, в ауд. 5652.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета.

Автореферат разослан “19” ноября 2010 г.

Ученый секретарь  
совета по защите докторских  
и кандидатских диссертаций

Болсунов К.Н.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Многообразные загрязняющие вещества, попадая в окружающую среду, могут претерпевать в ней различные изменения, усиливая при этом свое токсическое действие. Это приводит к необходимости разработки комплексных, интегральных методов контроля качества объектов окружающей среды. Эти задачи решает экотоксикология, одним из основных методов которой является биотестирование - технология, при которой лабораторно выращенные организмы, биологические системы или биологические процессы (тест-объекты) используют для измерения эффектов (тест-реакций), вызванных химическим воздействием.

По мере повышения уровня организации живого усложняется идентификация воздействия вредного фактора и увеличивается время проявления вызванного им эффекта. Биотестирование на уровне популяций микроорганизмов позволяет существенно сократить время выявления эффекта и оценить степень вредности для определенных форм живого, и создать предпосылки для разработки аппаратных методов. В настоящее время большинство подобной аппаратуры ориентировано на использование в качестве тест-объекта штаммов бактерий, тогда как главным требованием международных стандартов в области биотестирования является применение организмов нескольких филогенетических уровней и тест-реакций.

К перспективным популяционным реакциям, которая уже апробирована, как тест-реакция токсичности водных сред, относится гальванотаксис инфузорий *P. Caudatum*, проявляющийся в перемещении микроорганизмов под действием внешнего управляющего электрического поля. Поле переменной полярности дает новые возможности применения динамики гальванотаксиса для исследования особенностей влияния токсиканта на популяцию.

**Целью диссертационной работы** является разработка метода и средств контроля токсичности водных сред по тест-реакции динамики гальванотаксиса инфузорий *P. Cadatum*.

**Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:**

1. Разработать математическую модель, отражающую пространственно-временную динамику оптических характеристик взвеси инфузорий при протекании гальванотаксиса в чистой и токсичной средах.
2. Разработать биотехническую систему контроля токсичности водных сред, с применением в качестве тест-реакции динамики гальванотаксиса.
3. Разработать метод и систему регистрации динамики гальванотаксической тест-реакции в поле переменной полярности.
4. Разработать аппаратный метод контроля токсичности водных сред, позволяющий получить функциональную зависимость и количественный критерий, отражающие токсичность среды и особенности воздействия токсиканта на тест-объект.

**Объектами исследования** являются система биотестирования токсичности водных сред.

**Предметом исследования** является информационное, методическое, метрологическое и аппаратное обеспечение системы биотестирования.

**Методы исследования** Исследование базируется на методах математического описания процессов популяционного движения микроорганизмов рекуррентными последовательностями, методах построения биотехнических систем, методах исследования биологических сигналов, методах фотометрии и исследования случайных процессов и сигналов.

**Новые научные результаты:**

1. Рекуррентная математическая модель, одновременно учитывающая пространственно-временную динамику распределения клеток по объему кюветы, количество переключений полярности, этологические особенности микроорганизмов и характеристики их светорассеяния, позволяющая прогнозировать и описывать фазы реакции.
2. Обобщенная структура биотехнической системы, позволяющая проводить контроль токсичности водных сред по реакции динамики гальванотаксиса инфузорий.
3. Метод и средства регистрации, позволяющие получить новый сигнал динамики гальванотаксиса по показателю кинетики оптической плотности взвеси, образующий импульсную последовательность.
4. Метод контроля токсичности водных сред с применением тест-реакции динамики гальванотаксиса инфузорий.

**Практическая ценность работы:**

1. Обоснована последовательность метода контроля токсичности водных сред на основе оптического контроля тест-реакции в приэлектродной зоне кюветы, обеспечивающего выделение сигнала на фоне помех и его идентификацию.
2. Разработан макет экспериментального блока формирования новой гальванотаксической тест – реакции на основе мультивибратора и метод ее регистрации в виде импульсной последовательности с помощью стандартного фотометрического прибора.
3. Обоснованы информативные признаки токсичности на основе анализа огибающей амплитуд импульсов.
4. Предложенный индекс токсичности позволил выявить различия влияния соединений тяжелых металлов на микроорганизмы при тест-реакции и получить статистически воспроизводимые численные значения, соответствующие их ПДК.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Метод биотестирования с использованием динамики гальванотаксиса в качестве тест-реакции позволяет, на основе измерения кинетики оптической плотности взвеси клеток, получать показатели токсичности водных сред.

2. Система формирования и регистрации гальванотаксического сигнала, обоснованная с помощью рекуррентной математической модели, позволяет получить импульсную последовательность как процесс перехода к установившемуся состоянию, характеризующему количество жизнеспособных микроорганизмов в популяции.

**Достоверность результатов** обеспечена использованием при их получении надежных и проверенных теоретических представлений и экспериментальных методов и технологий; численными расчетами, проведенными на основании полученных соотношений; статистическими оценками величин и характера вытекающих из них зависимостей с использованием надежных экспериментальных данных.

**Внедрение результатов работы.** Результаты работы внедрены в НИР БЭС-100 «Разработка теоретических основ построения биотехнических систем оценки и управления состоянием человека и окружающей среды», 2009-2010 гг.; НИР БЭС-112 «Теоретические и физические исследования измерительных процессов в системах био- и техногенного происхождения», 2009-2010 гг.; МРИ-БЭС-105 «Теоретические основы построения телемедицинских систем профилактики здоровья учащихся региона» 2009–2010 гг.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных конференциях по Мягким вычислениям и измерениям (SCM) – Санкт-Петербург 2005, 2006, 2007 гг., на международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» - 2006 г., на Всероссийских научно-практических конференциях «Проблемы прогнозирования и предотвращения чрезвычайных ситуаций и их последствий» - Санкт-Петербург 2004, 2005, 2006 гг., на Всероссийской конференции «Региональная информатика» - Санкт-Петербург 2008 г., на Всероссийских конференциях «Медицинские информационные системы (МИС)» - Таганрог 2009, 2010 гг., на Научно-технических конференциях профессорско-преподавательского состава Санкт-Петербургского государственного электротехнического Университета (ЛЭТИ) 2005, 2006, 2007, 2008, 2009 гг.

**Публикации по работе.** Основные теоретические и практические результаты диссертации опубликованы в 18 научных работах, из них – 7 статей, среди которых 5 опубликованы в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК, 11 работ – в материалах международных, всероссийских и межвузовских научно-практических конференциях.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы, включающего 75 наименований, и двух приложений. Основная часть работы изложена на 140, страницах машинописного текста. Работа содержит 14 таблиц и 76 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обосновывается актуальность темы, цель и задачи исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** диссертации приведен анализ подходов к разработке микробиотеста на основе тест-реакции динамики гальванотаксиса в поле переменной полярности.

Биотестирование является основным лабораторным методом экотоксикологии, дополняющим аналитический контроль, причем, согласно международным и национальным стандартам, оно должно проводиться с применением нескольких организмов разных филогенетических уровней и тест-реакций, что обуславливает необходимость разработок новых биотестов. В развитии биотестовых методов с 90-х гг., как показал обзор современных отечественных и иностранных источников, во всем мире наблюдается тенденция перехода к аппаратурным микробиотестам, являющимся разновидностью биотехнических систем (БТС), которые используют в качестве тест-объекта организмы микроразмеров.

В работах Ковалевской А.С. была обоснована возможность использования гальванотаксиса инфузорий – перемещения их популяции под действием электрического поля, в качестве тест-реакции аппаратурного микробиотеста и созданы макеты экспериментальных установок для ее регистрации и визуализации. К достоинству гальванотаксиса как тест-реакции можно отнести экспрессность. К недостаткам относится нестационарность сигнала как временная, так и пространственная, что предъявляет требование точной фиксации области контроля реакции.

Проведенный обзор литературы позволил сформулировать цели и задачи исследования.

**Вторая глава** посвящена разработке рекуррентной математической модели популяционного процесса гальванотаксиса, отражающей формирование распределения количества клеток в кювете как зависимость последующих значений от предыдущих.

На основе представления о механизме формирования экспоненциального распределения клеток из равномерного при гальванотаксисе предполагается, что в отсутствие электрического поля количество клеток в каждой зоне кюветы равно  $A$ , а при воздействии поля из каждой зоны кюветы в течении интервала времени  $\Delta t$  перемещается к катоду доля клеток  $\alpha$ .

Математические выражения, полученные для описания изменения количества клеток в ячейках  $n_1-n_l$  в моменты  $t_1-t_k$  первого этапа реакции, представлены в таблице 1. Нумерация ячеек в обеих фазах идет от анода.

В общей форме функцию изменения количества клеток в ячейке  $l$  ( $1-l-1$ ) в момент времени  $k$  можно описать рекуррентной формулой:

$$n_{lk} = A(1-\alpha)^{k-l+1} \sum_{j=0}^{l-1} V_{jk} \alpha^j ; V_{jk} = \sum_{i=0}^j m_{i(k-1)} \quad (1)$$

где  $m_i$  – множитель  $\alpha^i$  в сумме, описывающей изменение количества объектов в ячейке  $l$  в  $k$ - $l$ -момент времени. В момент начала движения объектов в ячейке  $m_0=1$ .

Рекуррентная модель первого этапа реакции

Таблица 1.

$t_i$	Количество клеток в ячейках					
	$n_1(t)$	$n_2(t)$	$n_3(t)$	$n_4(t)$	...	$n_l(t)$
$t_0$	$A$	$A$	$A$	$A$	...	$A$
$t_1$	$A(1-\alpha)$	$A$	$A$	$A$	...	$A+A\alpha$
$t_2$	$A(1-\alpha)^2$	$A(1-\alpha)$ ( $1+\alpha$ )	$A$	$A$	...	$A+2A\alpha$
$t_3$	$A(1-\alpha)^3$	$A(1-\alpha)^2$ ( $1+2\alpha$ )	$A(1-\alpha)$ ( $1+\alpha+\alpha^2$ )	$A$	...	$A+3A\alpha$
$t_4$	$A(1-\alpha)^4$	$A(1-\alpha)^3$ ( $1+3\alpha$ )	$A(1-\alpha)^2$ ( $1+2\alpha+3\alpha^2$ )	$A(1-\alpha)$ ( $1+\alpha+\alpha^2+\alpha^3$ )	...	$A+4A\alpha$
$t_5$	$A(1-\alpha)^5$	$A(1-\alpha)^4$ ( $1+4\alpha$ )	$A(1-\alpha)^3$ ( $1+3\alpha+6\alpha^2$ )	$A(1-\alpha)^2$ ( $1+2\alpha+3\alpha^2+4\alpha^3$ )	...	$A+5A\alpha$
$t_6$	$A(1-\alpha)^6$	$A(1-\alpha)^5$ ( $1+5\alpha$ )	$A(1-\alpha)^4$ ( $1+4\alpha+10\alpha^2$ )	$A(1-\alpha)^3$ ( $1+3\alpha+6\alpha^2+10\alpha^3$ )	...	$A+6A\alpha$

Для последней ячейки, в которой накапливаются объекты, их количество за время  $k$  отсчетов описывается формулой:

$$n_k = A \left( 1 + \sum_{i=0}^{k-1} n_i \alpha \right) \quad (2)$$

Математические выражения, приведенные в таблице 2, описывают распределение клеток в кювете на втором этапе гальванотаксиса, когда они движутся к новому катоду. Для упрощения предполагалось, что клетки сконцентрированы в первой ячейке и их количество равно  $B$ , а доля клеток, переходящая в соседнюю ячейку в каждый момент времени равна  $\beta$ .

Рекуррентная модель второго этапа реакции

Таблица 2.

$t_i$	Количество клеток в ячейках					
	$n_1(t)$	$n_2(t)$	$n_3(t)$	$n_4(t)$	...	$n_l(t)$
$t_0$	$B$	$0$	$0$	$0$	...	$0$
$t_1$	$B(1-\beta)$	$\beta B$	$0$	$0$	...	$0$
$t_2$	$B(1-\beta)^2$	$2\beta B(1-\beta)$	$\beta^2 B$	$0$	...	$0$
$t_3$	$B(1-\beta)^3$	$3\beta B(1-\beta)^2$	$3\beta^2 B(1-\beta)$	$\beta^3 B$	...	$0$
$t_4$	$B(1-\beta)^4$	$4\beta B(1-\beta)^3$	$6\beta^2 B(1-\beta)^2$	$4\beta^3 B(1-\beta)$	...	$0$
$t_5$	$B(1-\beta)^5$	$5\beta B(1-\beta)^4$	$10\beta^2 B(1-\beta)^3$	$10\beta^3 B(1-\beta)^2$	...	$\beta^5 B$
$t_6$	$B(1-\beta)^6$	$6\beta B(1-\beta)^5$	$15\beta^2 B(1-\beta)^4$	$20\beta^3 B(1-\beta)^3$	...	$\beta^5 B + 5\beta^5 B(1-\beta)$

В общей форме функцию изменения количества клеток в ячейке  $l$  ( $1-l-1$ ) в момент времени  $k$  можно описать рекуррентной формулой:

$$n_{lk} = B \cdot \beta^{l-1} \sum_{i=0}^{k-1} m_{i(k-1)} (1-\beta)^{k-l+1} \quad (3)$$

где  $m_l$  – множитель  $\beta$  в сумме, описывающей изменение количества объектов в ячейке  $l$  в  $k-1$  момент времени и принимающий значение 1 в момент начала движения объектов в ячейке.

Для последней ячейки, в которой накапливаются объекты, их количество за время  $k$  описывается формулой:

$$n_k = \sum_{i=0}^{k-1} n_{li} \beta \quad (4)$$

Поскольку  $\alpha$  и  $\beta$  определяют движение клеток, то в общем случае они зависят от биологических, технических и токсических факторов.

Рекуррентная модель позволила выявить механизм не только формирования начального распределения слоя клеток у катода, но и трансформации слоя инфузорий при его движении к новому катоду.

С учетом того, что при гальванотаксисе взвесь инфузорий образует мутный слой, в качестве контролируемого параметра реакции была выбрана оптическая плотность.

$$D(\lambda) = 0,434 C \cdot S_{\text{ч}} \cdot b, \quad (5)$$

где  $b$  – толщина слоя частиц,  $C$  – концентрация частиц,  $S_{\text{ч}}$  – сечение рассеяния частицы. Предполагая, что объем  $v_0$  каждой контролируемой зоны кюветы одинаков, получим:

$$D_{lk}(\lambda) = n_{lk} \cdot \gamma; \quad (6)$$

где  $\gamma = 0,434 S_{\text{ч}} \cdot b / v_0$ .

Для исследования параметров модели рекуррентные последовательности были реализованы в виде  $m$  программных матриц форматом  $M [l \times k]$  в приложении Excel, где  $m$  – число однополярных этапов реакции;  $l$  – количество ячеек, на которые разбивается кювета;  $k$  – максимальное количество временных отсчетов внутри однополярной фазы.

Программный метод позволил учесть следующие факторы:

- остаточное количество клеток в ячейках при переключениях полярности электродов;
- наличие в популяции доли клеток  $\delta$ , способных двигаться против градиента потенциала электрического поля.

На рисунке 1 представлен алгоритм программной модели.

Блок № 1 – ввод начальных значений  $\gamma$ ,  $l$ ,  $k$ ,  $m$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ . Блок № 2 – Формирование начальной матрицы, где первая строка отражает равномерное распределение клеток в кювете, а вычисления производятся согласно формулам 1–2 и 5–6 в направлении от первой ячейки к последней по параметру  $\alpha$ , за исключением двух последних ячеек, для которых учитывается доля клеток  $\delta$ .





Рисунок 1. Алгоритм программной модели

Блок № 3 – Формирование матрицы, где первая строка задается как рекуррентно зависимая от последней строки предыдущей матрицы, а вычисления производятся согласно формулам 3–4 и 5–6 в направлении от последней ячейки к первой по параметру  $\beta$ . Блок № 4 – Формирование матрицы, аналогичной предыдущей, где вычисления производятся в направлении от первой ячейки к последней по параметру  $\alpha$ . Блок № 5 – Проверка достижения максимального количества переключений полярности электродов  $m_{\max}$ . Блок № 6 – Формирование гальванотаксического сигнала как единого столбца объединенной матрицы  $M[l \times m_{\max} k]$ .

На модели были получены сигналы кинетики оптической плотности, отражающие пространственно-временной процесс гальванотаксиса при однократном переключении полярности, исследованы зависимости амплитуд и формы сигналов от параметров модели. При моделировании многократного гальванотаксиса в электродной ячейке выявлено, что огибающая амплитуд импульсов характеризуется переходным процессом с нарастанием или спадом при разных сочетаниях значений  $\alpha$  и  $\beta$ , а затем установившейся величиной, что позволяет использовать ее в качестве характеристик токсичности водных сред.

**В третьей главе** обоснована возможность применения динамики оптической плотности для регистрации таксических реакций инфузорий и под-

робно исследован гальванотаксический сигнал с однократным переключением полярности в протяженной кювете с внутренним размером  $45 \times 10 \times 10$  для упрощения идентификации зон оптического контроля. Выбрана область оптического контроля тест-реакции и проведено сравнение с численной моделью, которое показало, что наиболее точно она описывает сигналы в приэлектродных областях кюветы. Так же это сравнение показало, что доля  $\alpha$  способна отражать токсичность исследуемой пробы (рисунок 2), и поэтому был выбран сигнал, получаемый в зоне катода в первой фазе реакции.

Эксперименты проводились на спектрофотометре СФ-56 при следующих условиях:  $C = 1000$  кл/мл;  $U$  на электродах составляло  $2$  в; длина волны падающего излучения  $\lambda = 560$  нм; ширина щели  $\Delta\lambda = 6$  нм; длительность реакции составило  $t = 120$  с; переключение полярности происходило через  $60$  с.;  $1$  мл тестируемой среды добавлялся к  $1$  мл взвеси клеток. Коэффициент корреляции между моделью и данными эксперимента составил  $r = 0,98$ , а значение критерия Фишера  $F = 0,3$  для опытов с чистой средой при  $F$  критическом  $3,88$ . Для среды с модельным токсикантом  $r = 0,93$ ,  $F = 5,06$  при  $F$  критическом  $3,88$ . Согласно модели, концентрация клеток уменьшается при добавлении токсиканта в  $2$  раза, что отражает амплитуда сигнала.

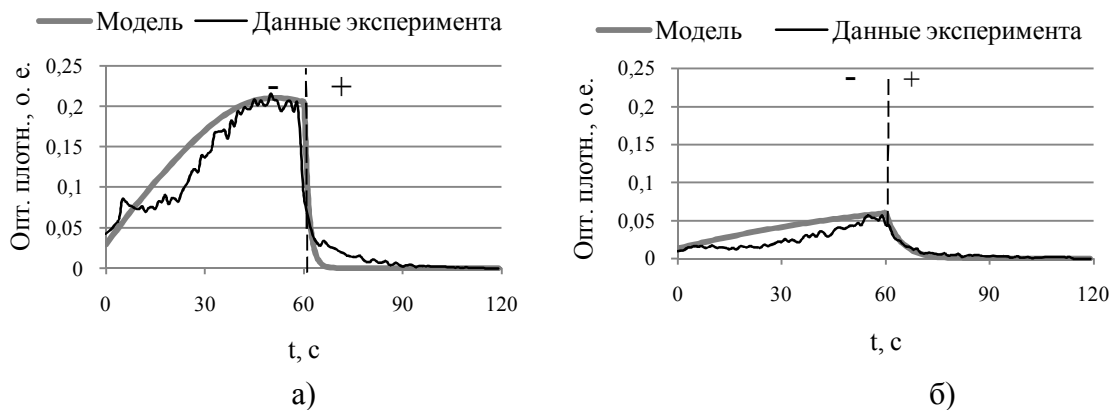


Рисунок 2. Сравнение экспериментальных данных а). в чистой среде (параметры модели:  $C = 1000$  кл/мл;  $\alpha = \beta = 0,2$ ,  $\delta = 0,02$ ;  $\gamma = 1,1 \times 10^{-5}$ ;  $k = 60$ ;  $l = 11$ ); б). при добавлении модельного токсиканта  $\text{CuSO}_4$  в концентрации  $1$  мг/л (параметры модели:  $C = 500$  кл/мл;  $\alpha = 0,1$ ;  $\beta = 0,2$ ,  $\delta = 0,02$ ;  $\gamma = 1,1 \times 10^{-5}$ ;  $k = 60$ ;  $l = 11$ )

Исследовано влияние технических и биологических факторов на тест-реакцию и доказано, что возраст культуры сильно влияет на вариацию формы сигнала у катода. При использовании взвеси клеток в начале стационарной фазы роста (3 дня) коэффициент корреляции между сигналами  $r = 0,96 - 0,99$ , а в начале фазы деградации (7 дней)  $r = 0,78 - 0,97$ .

Выбор длины волны падающего излучения видимого света ( $400, 560, 680$  нм) исходя из критерия обнаружения на фоне помех и воспроизводимости амплитуды сигнала определялся по максимальному отношению средней амплитуды к ее СКО, которому соответствовала  $\lambda = 560$  нм.

Исследованы сигналы у катода при разных напряжениях на электродах. При  $2$  в амплитуда  $A_D = 0,20 \pm 0,02$  и  $r = 0,91 - 0,97$ , а при  $1,3$  в  $A_D = 0,15 \pm$

0,02 и  $r = 0,96 - 0,99$ . Исходя из приведенных выше требований, было выбрано напряжение 2 v.

На основе проведенных исследований была разработана схема, отражающая связь параметров сигнала тест-реакции с исследованными техническими и биологическими факторами, и в качестве показателя количества жизнеспособных клеток была выбрана амплитуда сигнала.

Проанализированы три схемы организации эксперимента в поле многократной перемены полярности. Первая включала паузу  $\Delta t = 20$  с (напряжение на электродах отсутствовало) между циклами гальванотаксической реакции длительностью 120 с, описанной выше. Вторая – переключение полярности напряжения без паузы с разной длительностью фаз 60 с: 30 с без паузы. Третья – с одинаковой длительностью, 60 с без паузы.

Первая схема оказалась неудобной для организации эксперимента, так как не позволяет получить последовательность импульсов в одном цикле измерения. При второй схеме амплитуда импульсов в контроле нарастала по логарифмическому тренду  $R^2 = 0,95$ , при третьей – амплитуды колебались возле среднего значения. При выборе схемы организации эксперимента необходимо было учесть динамику импульсов для токсичной среды.

Проведены опыты с модельным токсикантом  $\text{CuSO}_4$  концентрацией 1 мг/л с предварительной выдержкой в пробе в течение 10 мин. При второй схеме амплитуда импульсов спадала по логарифмическому тренду  $R^2 = 0,95$  (рисунок 3а), при третьей – наблюдался спад амплитуд первых двух импульсов, а затем наступала стабилизация (рисунок 3б)

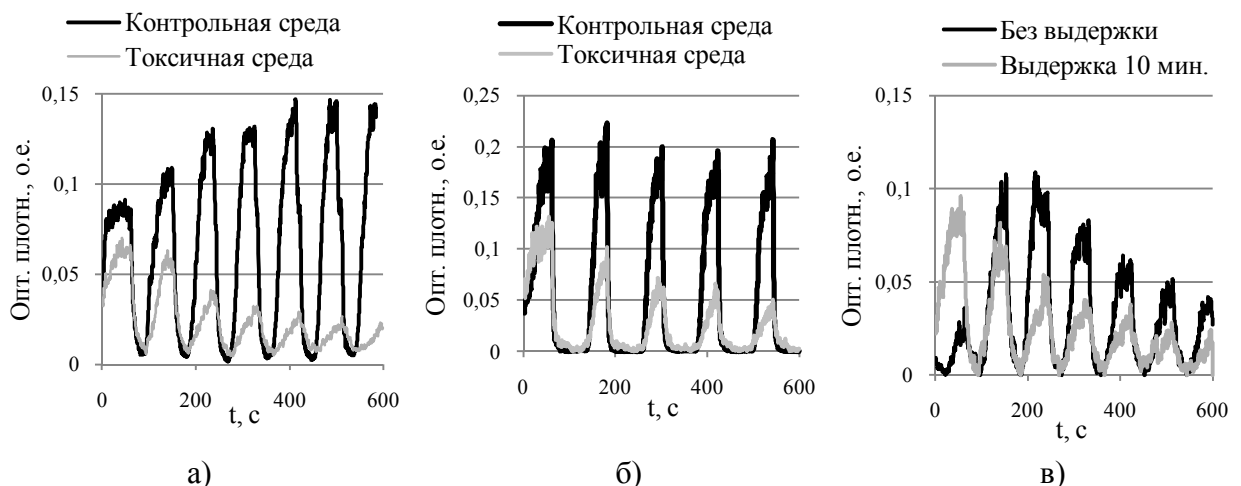


Рисунок 3. Опыты по исследованию способа организации гальванотаксиса с многократным переключением полярности: а) вторая схема; б) третья схема; в) исследование влияния предварительной выдержки

Исходя из результатов опытов, была выбрана третья схема эксперимента для дальнейшей аппаратной реализации, поскольку в этом случае различия в чистой и токсичной средах нагляднее из-за большей разности амплитуд импульсов сигналов для контрольной и токсичной сред. Сделан вывод, что опыты с токсикантом должны включать предварительную выдержку клеток в

пробе, что обеспечивает монотонность функции спада амплитуд импульсов сигнала (рисунок 3в).

Также была исследована случайная составляющая сигналов в чистой и токсичной средах, снимаемых в зоне катода, и доказано, что она не отражает воздействие токсичных веществ.

В третьей главе экспериментально обоснованы основные параметры тест-реакции, но используемые принадлежности (горизонтальная, протяженная кювета) нестандартны.

Для разработки метода контроля токсичности водных сред, ориентированного на широкий круг пользователей, необходимо использовать стандартные принадлежности оптических приборов, что обосновывало адаптацию измерительного средства (спектрофотометра СФ-56).

**Четвертая глава** посвящена разработке экспериментального макета блока формирования тест-реакции динамики гальванотаксиса (БФТР) как элемента биотестовой биотехнической системы – БТС (рисунок 4).

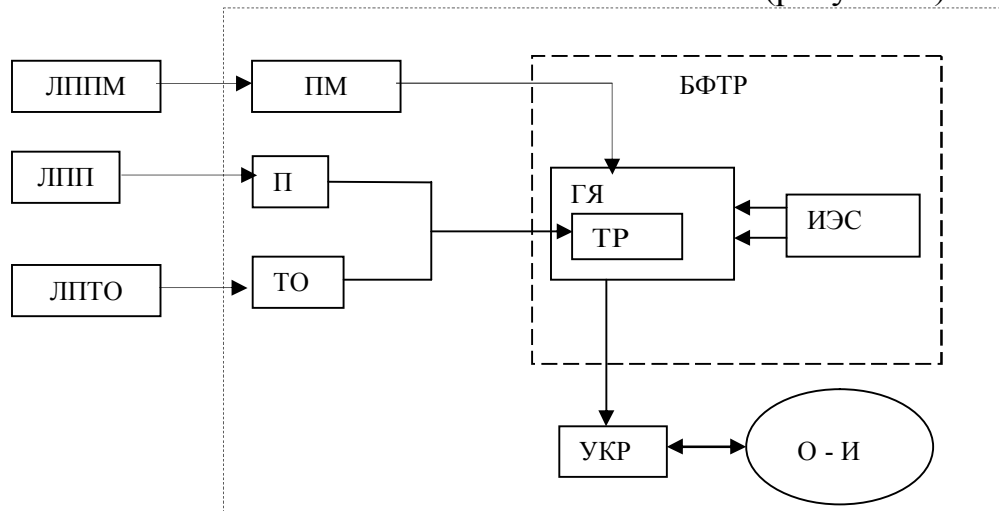


Рисунок 4. Биотестовая биотехническая система. ЛППМ – линия подготовки принадлежностей материалов; ЛПП – линия подготовки пробы; ЛПТО – линия подготовки тест-организма; БФТР – блок формирования тест-реакции; ПМ – принадлежности и материалы; ТО- тест-объект, ТР- тест-реакция, П – проба; ГЯ – гальванотаксическая ячейка; ИЭС – источник электрических стимулов; УКР – устройство контроля реакции; О-И – оператор-исследователь.

БФТР для реализации тест-реакции динамики гальванотаксиса, состоит из следующих элементов: ГЯ, включающей электроды и стандартную фотометрическую кювету (45×13×13) и ИЭС. Для связи ГЯ и ИЭС, выделения контрольной зоны вблизи электрода и обеспечения бесконтактного фотометрического контроля тест-реакции на основе принципа контрольного образца, функцию которого выполняла кювета с чистой средой, был разработан кюветный модуль (рисунок 5).

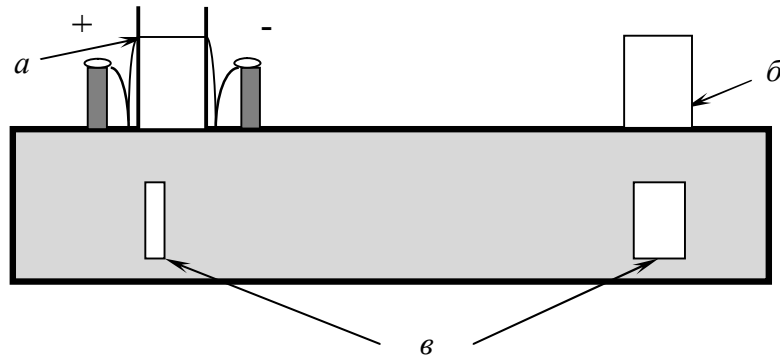


Рисунок 5 Кюветный модуль для исследования гальванотаксиса. а). гальванотаксическая ячейка; б). кювета с чистой средой Л.-Л.; в). контролируемая область.

В качестве управляющих стимулов исследованы с помощью генератора Г6-15 три вида импульсов амплитудой 2 в: синусоидальный, треугольный и прямоугольный. Ввиду отсутствия принципиальных различий формы и амплитуды вызванных гальванотаксических импульсов, для простоты реализации ИЭС был выбран прямоугольный импульс. На основе результатов экспериментов был разработан специализированный генератор на интегральном таймере, обеспечивающий формирование последовательности прямоугольных импульсов с амплитудой 2 в и регулируемой длительностью 10 – 15 с; автоматический режим включения электродов и переключения их полярности; индикацию уровня напряжения; контроль подключения электродов. Стабильность частоты генератора определяется преимущественно температурной стабильностью емкостей и сопротивлений, которая характеризуется соответственно коэффициентами ТКЕ и ТКС, а так же интегральных схем. Стабильность частоты подобных генераторов составляет 1 %.

Кюветный модуль позволяет адаптировать УКР (СФ-56) для регистрации тест-реакции в режиме кинетики оптической плотности с учетом результатов, приведенных в главе 3.

Исследованы метрологические аспекты регистрации тест-реакции с учетом особенностей кюветного модуля с диафрагмой в области электродной зоны.

Регистрируемый сигнал кинетики оптической плотности описывался как периодический импульсный процесс с изменяющимися амплитудами, смещенный относительно нулевого значения:

$$D(t) = D_0 + \sum_{i=1}^N D_i s(t - iT)$$

где  $D_0$  - постоянная величина, зависящая от начальных условий измерения (разность размеров диафрагм опытного и контрольного образцов);  $s(t - iT)$  – функция, описывающая гальванотаксический сигнал как импульсный процесс с периодом  $T$ ;  $D_i$  - амплитуда  $i$ -го импульса.

Исследованы выявленные систематические погрешности при регистрации сигнала гальванотаксиса. Показано на модели и экспериментально, что существует резкое отличие формы сигналов вблизи электрода и других зонах

кюветы, позволяющее идентифицировать погрешность смещения оптического канала. Исследовано отношение «сигнал-фон» в виде:

$$\frac{S}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N D_i s(t - iT)}{D_0 + \sum_{j=1}^k D_j + D_э}$$

где  $D_j$  – оптическая плотность среды во время четных циклов гальванотаксической реакции (при положительном напряжении на контролируемом электроде);  $D_э$  – начальная оптическая плотность, обусловленная перекрытием части падающего потока электродом. Выявлено, что погрешности, определяемые апертурой и внешним фоном изменяют только начальное смещение, чтобы их устранить сигнал разбивали на участки длительностью  $T$ , на каждом из которых вычисляли минимальное значение и вычитали его из сигнала  $D(t)$ .

Результаты, полученные в четвертой главе, позволили обосновать необходимые процедуры для выделения из регистрируемого процесса полезного сигнала в виде импульсной последовательности, огибающая которой была выбрана в качестве информативного параметра метода контроля токсичности водных сред.

**Пятая глава** посвящена исследованиям особенностей гальванотаксического сигнала в поле переменной полярности. Изучалось два участка сигнала, в первом из которых наблюдалось изменение амплитуд гальванотаксических импульсов, а на втором – их стабилизация. Подтверждена гипотеза нормальности распределения значений амплитуд на участке стабилизации.

Получена линейная зависимость с коэффициентом детерминации  $R^2 = 0,99$  среднего значения амплитуд импульсов стабильного участка от концентрации инфузорий в кювете, что подтверждает положения математической модели с многократным переключением полярности; обоснован диапазон рабочей концентрации микроорганизмов, применяемый в тест-реакции.

Для объяснения природы возникновения роста амплитуд на первом участке огибающей импульсов и их стабилизации на втором, выдвинута гипотеза, согласно которой гальванотаксис в безвредной среде характеризуется как эустресс, а в токсичной, как дистресс.

Общая схема метода контроля токсичности, включающая подготовительные (1 – 4), измерительные (5 – 6) и вычислительные (7 – 11) этапы, представлена на рисунке 8.

Для исследования токсичности водных сред с учетом природы гальванотаксиса обоснован новый вид индекса токсичности:

$$K = I - A_i / A_{к.маx}$$

где  $A_i$  – амплитуда  $i$ -го гальванотаксического импульса исследуемого сигнала,  $A_{к.маx}$  – максимальная амплитуда импульсов сигнала, полученного для чистой среды, т.е. контроля.

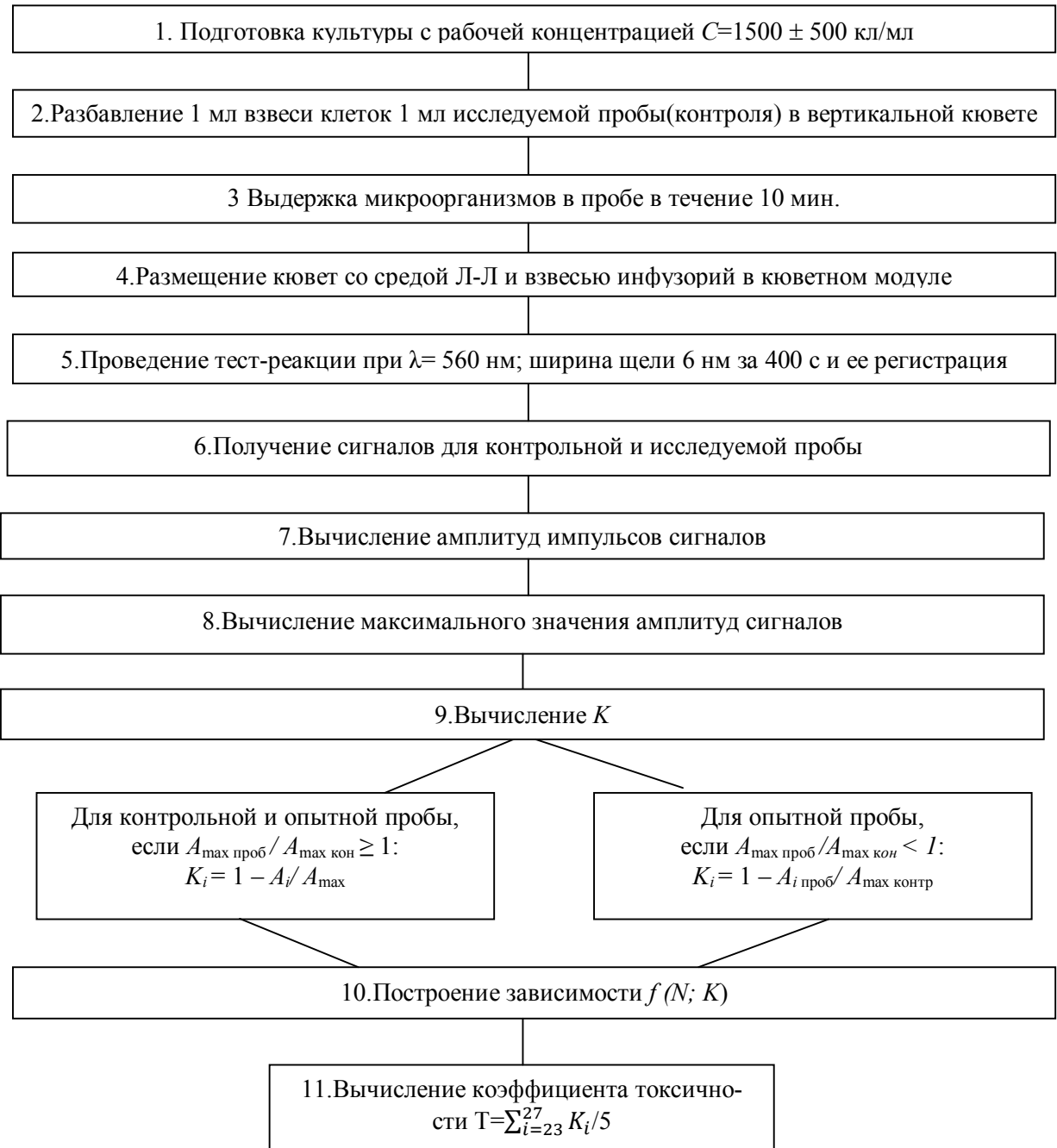


Рисунок 8. Схема метода контроля токсичности

Такое представление объясняется тем, что в контроле не все клетки сразу проявляют гальванотаксис, а динамика проявления реакции является важной характеристикой безвредности исследуемой пробы, поэтому строится динамическая зависимость как функция  $f(N; K)$ , где  $N$  – номер импульса сигнала,  $K$  – индекс токсичности. На рисунке 9 показаны зависимости для разных концентраций модельного токсиканта  $\text{CuSO}_4$ .

Минимальное значение кривой показывает уровень токсичности или сколько клеток не проявили гальванотаксис, а наклон может характеризовать то, насколько быстро произошла адаптация к токсиканту. Линия, соответствующая контролю, описывается полиномиальным трендом второй степени с  $R^2 = 0,98$ , т.е. наблюдается постепенный рост амплитуды в сигнале. В целом,

линии контроля, 0,1 и 1 мг/л, имеют сходную форму (коэффициент корреляции составляет 0,85 – 0,91).

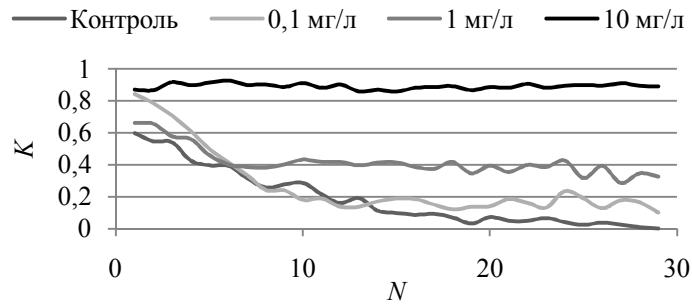


Рисунок 9 Функция индекса токсичности для модельного токсиканта  $\text{CuSO}_4$

Кривая, соответствующая концентрации модельного токсиканта 10 мг/л, представляет собой незначительные колебания в диапазоне 0,86... 0,93 ед. Аналогичные графики были построены для токсикантов  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  для концентраций 1 мг/л и 10 мг/л. Результаты экспериментов с разными токсикантами сравнивались по значениям, полученным как среднее по пяти последним точкам кривой с рассчитанным доверительным интервалом для токсичных сред в пределах 1 – 12 % (см. таблицу 3), что позволяет использовать этот показатель в качестве количественного критерия токсичности.

Значения коэффициента токсичности для разных токсикантов

Таблица 3.

Токсикант	ПДК для питьевой воды по ионам металлов, мг/л	Коэффициент токсичности при концентрации токсиканта в пробе, мг/л	
		1	10
$\text{NiSO}_4$	0,1	0,69±0,01	0,99±0,01
$\text{CuSO}_4$	1	0,33±0,04	0,90±0,01
$\text{ZnSO}_4$	5	0,05±0,05	0,88±0,01

Экспериментально получена зависимость между значениями индексов токсичности для соединений тяжелых металлов и их ПДК для питьевой воды. Эксперименты показали возможность использования данного метода для контроля токсичности водных растворов солей тяжелых металлов.

**В заключении** сформулированы основные научные и практические результаты работы, полученные автором.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Разработана новая тест-реакция динамики гальванотаксиса инфузорий в поле переменной полярности как элемент БТС контроля токсичности водных сред.
2. Предложены рекуррентные математические модели для описания пространственно-временного процесса гальванотаксиса инфузорий при однократном и многократном переключении полярности электродов и исследована их статистическая значимость.
3. Разработан метод и средства формирования и регистрации тест-реакции с помощью гальванотаксической ячейки, генератора импульсов



прямоугольной формы и кюветного модуля для спектрофотометра, измеряющего кинетику оптической плотности взвеси инфузорий.

4. Разработан метод контроля токсичности водных сред, позволяющий получить новый вид индекса токсичности, оцениваемого не только значениями, но и функцией, вид которой может отражать характер воздействия токсиканта на тест-организм. Получена высокая корреляционная зависимость между значениями индексов токсичности для соединений тяжелых металлов и их ПДК.

## **ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### ***Издания, рекомендованные ВАК России:***

1. Захаров, И.С. Аппаратурно регистрируемые характеристики и математическая модель гальванотаксического сигнала [Текст] / И.С. Захаров, А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева и др. // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ», Сер. Биотехнические системы в медицине и экологии. – СПб., 2006. – Вып.1. – С. 52 – 57.

2. Ковалевская, А.С. Определение токсичности водных сред по реакции гальванотаксиса [Текст] / А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева, С.В. Голядкин и др.// Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ», Сер. Биотехнические системы в медицине и экологии. – СПб., 2006. – Вып.3. – С. 73 – 77.

3. Захаров, И.С. Рекуррентная модель гальванотаксиса для приборов контроля токсичности водных сред [Текст] / И.С. Захаров, А.Г. Казанцева. // Известия ЮФУ, Технические науки, Тематический выпуск. «Перспективы медицинского приборостроения» – Таганрог, 2009. – Вып. 10 (99) - С. 214 – 217.

4. Казанцева, А.Г. Исследование влияния биологических и технических факторов на тест-реакцию гальванотаксиса [Текст] / А.Г. Казанцева, И.С. Захаров.// Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – СПб., 2010. – Вып.5. – С. 109 – 114.

5. Захаров, И.С. Теоретические основы метода контроля токсичности водных сред с использованием тест-реакции гальванотаксиса инфузорий [Текст] / И.С. Захаров, А.Г. Казанцева. // Известия ЮФУ, Технические науки, Тематический выпуск. «Медицинские информационные системы» – Таганрог, 2010. – Вып. 9 (110) - С. 122-126.

### ***Другие статьи и материалы конференций:***

1. Захаров, И.С. Рекуррентная модель тест-реакции гальванотаксиса инфузорий [Текст] / И.С. Захаров, А.Г. Казанцева.// Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – СПб., 2009. – Вып.5. – С. 63 – 66.

2. Захаров, И.С. Исследование оптических свойств взвеси инфузорий [Текст] / И.С. Захаров, А.Г. Казанцева.// Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – СПб., 2010. – Вып.1. – С. 55 – 62.

3. Захаров, И.С. Измерительно-вычислительный комплекс для исследования алгоритмов обработки биотестовой информации [Текст] / И.С. Захаров, А.В. Пожаров, А.Г. Казанцева и др. // Материалы науч.-практ. конф. «Проблемы прогнозирования и предотвращения чрезвычайных ситуаций и их последствий», 24 ноября 2004 г. – СПб., 2004.– С.86-87.

4. Захаров, И.С. Модификация установки для контроля острой токсичности водных сред с использованием гальванотаксиса [Текст] / И.С. Захаров, А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева и

др. // Материалы науч.-практ. конф. «Проблемы прогнозирования и предотвращения чрезвычайных ситуаций и их последствий», 23 ноября 2005 г. – СПб., 2005. – С.75-76.

5. Ковалевская, А.С. Методы контроля токсичности водных сред для чрезвычайных ситуаций [Текст] / А.С. Ковалевская, А. Г. Казанцева, С.В. Голядкин и др.// Материалы науч.-практ. конф. «Проблемы прогнозирования и предотвращения чрезвычайных ситуаций и их последствий», 29 ноября 2006 г. – СПб., 2006. – С. 18-21.

6. Захаров, И.С. Моделирование характеристик электрического поля при исследовании реакции гальванотаксиса [Текст] / И.С. Захаров, А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева и др. // Материалы IV междунар. Конгр. «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», 3 июля – 7 июля 2006 г. – СПб., 2006. – С.91.

7. Захаров, И.С. Измерение гальванотаксической реакции инфузорий с учетом ее самоорганизации [Текст] / И.С. Захаров, А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева // Материалы междунар. конф. «SCM-2005: Мягкие вычисления и измерения », 27-29 июня 2005 г. – СПб., 2005. – Т.2. - С. 18-19.

8. Захаров, И.С. Моделирование характеристик электрического поля при исследовании реакции гальванотаксиса [Текст] / И.С. Захаров, А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева // Материалы междунар. конф. «SCM-2006: Мягкие вычисления и измерения », 4 - 7 июля 2006 г. – СПб., 2006. – Т.2. - С. 96.

9. Казанцева, А.Г. Система для измерения концентрации инфузорий [Текст] / А.Г. Казанцева // Материалы междунар. конф. «SCM-2007: Мягкие вычисления и измерения », 25 - 27 июня 2007 г. – СПб., 2007. – Т.2. - С. 192.

10. Казанцева, А.Г. Изучение информативных параметров адаптации микроорганизмов, используемых при биомониторинге [Текст] / А.Г. Казанцева // Материалы всерос. конф. «Информационные технологии в экологии», 22 - 24 октября 2008 г. – СПб., 2008. – С. 273.

11. Вишневецкий, М.Ю. Разработка биотестового метода интегральной оценки экологического состояния акваторий [Текст] / М.Ю. Вишневецкий, И.С. Захаров, А.Г. Казанцева.// Сборник научных трудов «Поисковые научные исследования молодых ученых по техническим наукам в научно-образовательных центрах Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)». – СПб., 2009 г. – С. 67 – 76.

12. Казанцева, А.Г. Особенности формирования гальванотаксического сигнала в токсичной среде [Текст] / А.Г. Казанцева, И.С. Захаров.// Материалы 63-ей науч. – техн. Конф. профессорско-преподавательского состава университета СПбГЭТУ «ЛЭТИ». - СПб., 2010. – С. 254 – 260.

13. Малышкин, Н.Г. Исследование воздействия воды после электроочистки на жизнеспособность пресноводных и растительности [Текст] / Н.Г. Малышкин, А.С. Ковалевская, А.Г. Казанцева и др. // Сборник научных трудов «Поисковые научные исследования молодых ученых по техническим наукам в научно-образовательных центрах Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)» – СПб., 2010 г. – С. 14 – 20.