

На правах рукописи



Величко Анна Николаевна

**МЕТОД И СРЕДСТВО КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ
СРЕД НА БАЗЕ ТЕСТ-РЕАКЦИИ ТЕРМОТАКСИСА
PARAMESCIUM CAUDATUM**

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена на кафедре инженерной защиты окружающей среды Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)»

Научный руководитель –

Захаров Игорь Сергеевич, кандидат технических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)», доцент кафедры Инженерной защиты окружающей среды.

Официальные оппоненты:

- Петраш Владимир Валентинович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное унитарное предприятие Научно-исследовательский институт промышленной и морской медицины Федерального медико-биологического агентства, ведущий научный сотрудник.
- Крымская Рената Сергеевна, кандидат технических наук, ООО «Ресайкл», генеральный директор.

Ведущая организация –

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится 29 ноября 2016 г. в 16.00 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.238.10 Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) и на сайте eltech.ru.

Автореферат разослан 28 сентября 2016 г.

Ученый секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций



Садыкова Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Токсичность, или биологическая вредность, – фактор, определяющийся на основе биологической реакции. Экотоксикология, объединившая экологию и токсикологию, активно развивается, привлекая возможности технологий биотестирования на основе неразрушающего контроля. Существующие проблемы оценки экотоксичности в сложных экологических системах описаны у Куценко С.А. (2003). В последние годы важной проблемой стало изучение взаимодействия температуры и токсичности (К. Д. Гордон, 2005).

Микробиотестирование – новая область биотестирования, использующая организмы малых размеров и малые объемы проб, что требует аппаратные средства контроля тест-реакций (А. В. Пожаров, 1978; Г. В. Рид, Д. М. Харкин, К. Е. Густавсон, 1998). Использование в качестве тест-реакций популяционных перемещений организмов под действием градиента физических или химических факторов – таксисов – позволяют обеспечить статистическую достоверность. В последние годы были исследованы различные виды таксисов инфузорий – хемотаксис, гальванотаксис и динамика гальванотаксиса.

Термотаксис – направленное перемещение организмов в зону оптимальной температуры. В начале XXI века было выявлено, что свойства термотаксиса инфузорий сходство с температурной регуляцией многоклеточных (Г. Малвин, 1994-98). Особенно важно исследование температурной регуляции животных в условиях проявляющегося в мире глобального потепления, которое побуждает к миграции многие популяции организмов (К. Д. Гордон, 2005). Одноклеточные организмы, не обладая нервной системой, образуют плавающие структуры, способные находить зону температурного оптимума (М. Мендельсон, 1905; К. Гертер, 1934). Не имея температурных рецепторов, эти организмы реагируют на остро опасные воздействия, чтобы обеспечить выживание популяции (К. Тавада, Ф. Оосава, 1972; Т. Томинага, Я. Наитох, 1992). Современные открытия в области исследования термотаксиса показали возможность определения токсичности водных сред по температурной реакции инфузорий (Купер К.Е., 2002).

Проведенный аналитический обзор выделил две группы тестов, влияющих на процессы дыхания: тест *in vivo* на основе температурной реакции у базидиомицета *Trametes maxima* (О. И. Кляйн, 2013) и тест *in vitro* на основе субмитохондриальных частиц (Р. Тодешини, С. Ж. Бетио, Г. Гьюрин, 1996).

Выбор простейшими зоны комфортных температур, зависящий от гипоксии (К. Д. Гордон, 2005), инфекций (Г. Малвин, 2003), ряда химических токсикантов (Т. Иное, Ю. Накаока, 1996) и биохимических блокаторов метаболизма (С. Имада, Ф. Оосава, 1999), определяет актуальность создания приборного биотеста, основанного на температурном таксисе.

Однако современные исследования не вышли за границы лабораторных экспериментов, так как являлись технически сложными для реализации биотеста и при-

борной регистрации. Продолжались они более часа (К. Гертер, 1934). Существующие методы контроля в основном опирались на визуальные наблюдения и отсутствовали количественные критерии тест-реакции.

Целью диссертационной работы является разработка экспресс-микробiotеста токсичности водных сред на базе тест-реакции термотаксиса инфузорий.

Для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

1. Выявить влияние биологических и физических факторов на реакцию термотаксиса *Paramecium caudatum* и выделить главные факторы, определяющие возникновение тест-реакции.
2. Разработать математическую модель, описывающую температурное перераспределение популяции инфузорий в токсичной и нетоксичной среде.
3. Разработать компоненты инструментального, алгоритмического и программного обеспечения экспресс-микробiotеста на базе тест-реакции термотаксиса инфузорий для контроля токсичности водных сред.
4. Экспериментально апробировать экспресс-микробiotест на модельных токсикантах.

Объектом исследования данной работы являются приборы неразрушающего биотестового контроля токсичности водных среды.

Предметом исследования являются компоненты информационного, инструментального, методического и программно-алгоритмического обеспечения системы, реализующего контроль токсичности водных сред по реакции термотаксиса инфузорий.

Методы исследования. При выполнении работы использовались методы биотехнологий, математические методы моделирования, методы математической статистики, методы обработки цифровых изображений, а также информационно-программные методы моделирования.

Новые научные результаты:

1. Новое пространство информативных признаков биологических и физических факторов тест-реакции термотаксиса инфузорий, обеспечивающее возможность контроля токсичности водных сред.
2. Математическая модель движения популяции по кювете в условиях токсичности водной среды, позволяющая выявить процесс самоорганизации популяции.
3. Метод и средство контроля сигнала реакции термотаксиса *P. caudatum*.
4. Концепция экспресс-биотеста контроля токсичности водных сред на основе искусственной гипоксии инфузорий.

Практическая ценность работы:

1. Информационное пространство, основанное на параметрах биологических и физических факторов тест-реакции термотаксиса инфузорий, обеспечивает метод и средство контроля токсичности водных сред.

2. Алгоритмы и программная реализация на основе математических моделей позволяет получить информативные параметры, выявляющие изменение распределения популяции инфузорий при воздействии температуры и токсичности.
3. Совокупность предложенных элементов инструментального, алгоритмического и программного обеспечения экспресс-микробиотеста на базе тест-реакции термотаксиса инфузорий позволяет контролировать токсичность водных сред.
4. Метод аппаратно-программной регистрации параметров цифровых видеоизображений для контроля пространственно-временного распределения инфузорий, отражающих воздействие токсичных факторов на реакцию термотаксиса.
5. Результаты апробации экспресс-биотеста на модельных токсикантах – ингибиторах клеточного дыхания.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Биотестовый метод на основе искусственной гипоксии, изменяющей распределение инфузорий по кювете, позволил использовать термотаксис для контроля токсичности пресных водных сред.
2. Математический метод расчета коэффициентов перехода между последовательными распределениями популяции, позволил выявить процессы самоорганизации термотаксиса инфузорий.
3. Система аппаратно-программного контроля реакций инфузорий впервые позволила выявить градиент наклона линейного тренда популяционного распределения инфузорий как информативный параметр, отражающий воздействие токсичности на тест-реакцию термотаксиса.

Достоверность результатов исследования обеспечена корректным дополнением теоретических методов и постановки экспериментов; опорой на основные принципы проведения опытов в области биотехнологий; логикой исследования; анализом отечественных и зарубежных источников; учетом количества факторов, адекватного задачам; применение современных методов и статистических программ; расчетами, выполняемыми с помощью компьютерных программ.

Внедрение результатов работы. Результаты диссертационной работы нашли применение при выполнении НИР «БТС для контроля токсичности водных сред на базе тест-реакции термотаксиса инфузорий» конкурса грантов 2013 года для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга (договор серии ПСП №13064); в НИР «Разработка биотехнической системы для экспресс-контроля токсичности водных сред на основе тест-реакции термотаксиса *P. caudatum*» программы «УМНИК» (договор 9913ГУ/2015), а также внедрены в практику работы ООО «Центр Проектирования и Экологии» и отдела наладки, технического обслуживания и ремонта ООО «Мобильные Системы Диагностики Холдинг». Работа выполнена в рамках государственного заказа «Проведение научно-исследовательских работ (фундаментальных научных исследований, при-

кладных научных исследований и экспериментальных разработок)» базовой части государственного задания Минобрнауки России (код проекта 2548).

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на 25 научных конференциях, среди которых 15 конференций – международных (1 входит в базу Scopus, 2 – в базу IEEE), 3 конференции – межрегиональные (всероссийские), 7 конференций – ведомственных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 26 научных работ, среди которых 6 опубликованы в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК, 1 – в журнале, индексируемая Scopus, 19 – в материалах международных и российских научно-технических конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы, включающего 76 наименований. Основная часть работы изложена на 130 страницах. Работа содержит 10 таблиц и 84 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В первой главе обоснована необходимость применения тест-реакции термотаксиса *Paramecium caudatum* в качестве средства контроля токсичности водных сред.

Проанализированы существующие методы и средства контроля термотаксиса инфузорий, основанные на свойстве их популяционного приспособления к оптимальному диапазону температур за счет перемещения по тепловому градиенту. Данное свойство было использовано в методе Гертера и его разновидностях, основанных на принципе выявления максимума распределения концентрации популяции по кювете диапазона при движении организмов в условиях искусственного созданного температурного градиента. К недостаткам этого метода следует отнести длительность реакции - более часа. Кроме того, исследуется только перемещение максимума распределения популяции и невозможно выявление процессов, отражающих воздействие токсичности водных сред на температурную регуляцию простейших.

В литературном обзоре проведен анализ научных исследований, в которых было изучено воздействие на термотаксис эффекта гипоксии, что приводило к движению популяции инфузорий в область низких температур. Кроме того, в работах обнаружена связь исследуемой тест-реакции с веществами-ингибиторами клеточного дыхания, что обусловило изучение литературы для обоснования выбора модельных токсикантов. Математические модели, описывающие процесс термотаксиса, в изученных работах не были обнаружены, что ограничивало выбор информативных параметров.

Обоснован выбор в качестве методологической базы разработки средств контроля токсичности водных сред с использованием тест-реакции термотаксиса инфузорий – идеологии биотехнических систем (БТС) и проанализирован ряд аналогов

биотестовых БТС. В результате анализа существующих методов контроля пространственного распределения клеток были выбраны телевизионные методы, основанные на фото- и видеорегистрации пространственного распределения клеток, поэтому необходимо было создать программные продукты, позволяющие автоматически контролировать перемещение клеток и выявлять их информативные параметры.

Анализ библиографических источников позволил сформулировать цели и задачи исследования.

Вторая глава посвящена исследованию влияния биологического и физического факторов на тест-реакцию термотаксиса инфузорий, выбору температурных эффектов для выбора тест-реакции на токсичность.

Первый эффект был основан на локальном нагреве узкой протяженной кюветы: создавался температурный градиент, после чего вводился токсикант. При исследовании влияния токсичности на термотаксическую реакцию инфузорий выявлено, что организмы уходят от токсиканта, ощущая его градиент, и выделено несколько зон: зона гибели, скопления и вытеснения, где сохранялись жизнеспособные организмы.

Экспериментально показано, что в стратифицированной водной среде термодиффузия препятствует выходу токсиканта. Нагретые слои воды с токсикантом медленнее оказывают воздействие на среду, чем однородные по температуре слои.

Инфузории тифельки воспринимают в качестве вредного фактора антисептик – бриллиантовый зеленый. В ближней зоне к токсическому воздействию происходит лизис клеток, в следующей зоне образуется скопление из неподвижных целых клеток, а в дальней зоне сохраняются жизнеспособные особи.

Данный температурный эффект был исследован, но не был использован в качестве тест-реакции из-за сложности контроля диффузии токсикантов, не являющихся красителями.

В главе приведены исследования другого температурного эффекта, основанного на локальном охлаждении, который был положен в основу экспресс-метода проверки термотаксической реакции (рис.1). Этот метод основан на свойстве инфузорий при гипоксии (температура воды $26 \pm 1^\circ\text{C}$) двигаться к зоне с пониженной температурой. Метод включает три фазы:

1. Начальное распределение инфузорий по узкой протяженной кювете близкое к равномерному, условно показано на графике в виде аппроксимирующей линейной функцией с наклоном $\alpha=0$.
2. Термотаксис при перемещении инфузорий к охлаждающему элементу аппроксимируется линейной функцией с наклоном $+\alpha$.
3. При перемещении популяции от охлаждающего элемента у аппроксимирующей линейной функции наклон $-\alpha$.

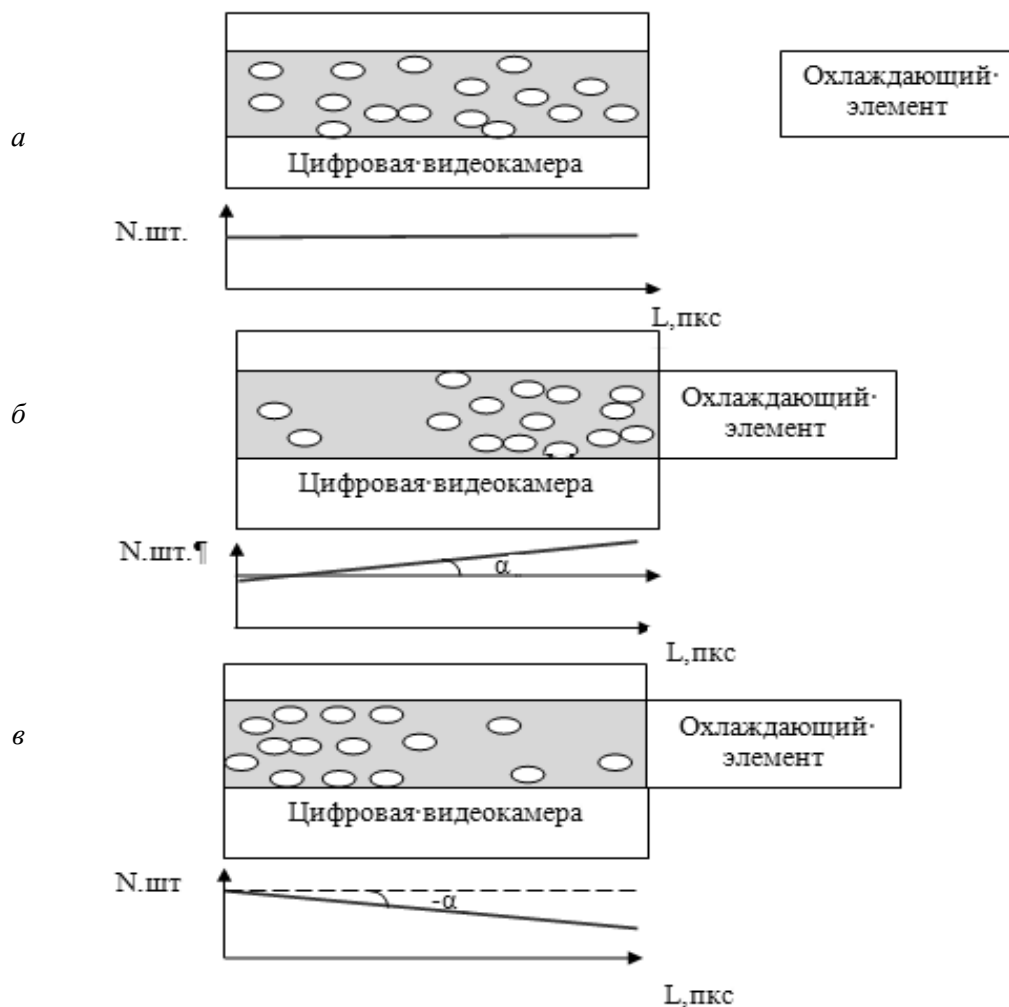


Рис. 1. Схема формирования реакции термотаксиса (а - при $\alpha=0$; б - при $+\alpha$; в - при $-\alpha$).

Распределение инфузорий по кювете регистрировалось с помощью цифровой видеокамеры, а обработка проходила при помощи разработанных алгоритмов (приведены в главе 4).

Для проверки формирования тест-реакции термотаксиса применялся метод источника холода, как фактора физиологической нагрузки, в качестве которого использовалась ячейка со льдом в металлическом корпусе, прижимаемая к стенке стеклянной кюветы с правой стороны. В главе также рассмотрены термодинамические факторы.

На рис. 2 представлены результаты исследования, основанные на проверке влияния модельного токсиканта CuSO_4 (1 мг/л) на принудительное движение микроорганизмов под действием температур как физиологической нагрузки. Инфузории выдерживались в растворе токсиканта 5 мин. Коэффициент наклона функции линии регрессии, отражает первоначально равномерное распределение инфузорий по кювете (1 – линейная зависимость $y = 1,8014x + 3491,1$), которое при воздействии низкой температуры быстро (0-2 мин) изменяется за счет ухода инфузорий от зоны более теплых температур к более холодным (2 – линейная зависимость $y = 10,266x + 2497,6$). После выдержки в растворе токсиканта реакция исчезает и сохраняется прежнее равномерное распределение (3 – линейная зависимость $y = -0,2042x + 4129,9$), так как токсичная среда повлияла на популяцию инфузорий.

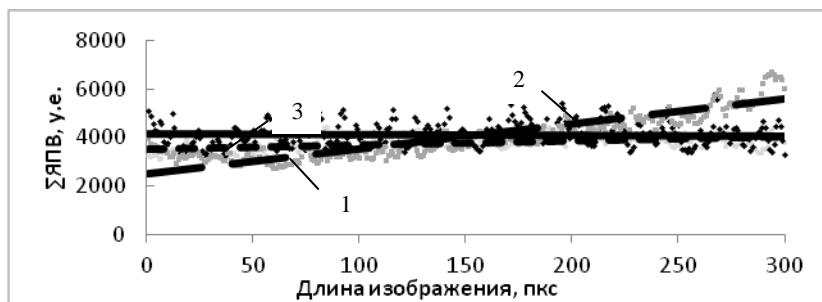


Рис. 2. Распределение инфузорий по узкой кювете под действием токсиканта CuSO_4 .

На рис. 3 представлен вид термотаксической реакции (контроль) для четырех опытов, в которых в течении 5 мин регистрировалось перемещение инфузорий в узкой протяжной кювете в условиях градиента температур (концентрация инфузорий составляет 2500 кл/мл, разница температур между двумя стенками узкой кюветы составляет 4°C). Максимум термотаксической реакции достигается при 60 ± 10 с. Статистическая проявляемость термотаксиса при данных условиях составила 100% в 9 опытах. Корреляция между сериями опытов составляет $0,91 \dots 0,99$. Среднее значение максимума термотаксической реакции для 9 опытов составляет $5,95 \pm 0,01$.

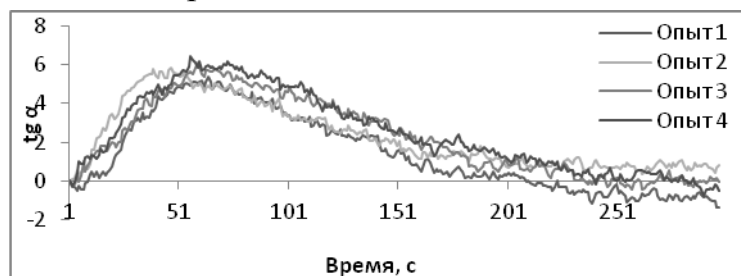


Рис. 3. Термотаксическая реакция простейших (для контроля).

В качестве биологических и физических факторов исследовались зависимости термочувствительности от возраста культуры, фаз роста и времени тестирования. При исследовании влияния возраста инфузорий на тест-реакцию термотаксиса (рис. 4) выявлено, что термочувствительность усиливается по мере возраста культуры и соответствует фазам насыщения (стационарная фаза) и деградации (фаза замедления роста) – 7-14 дней у *Paramecium caudatum*. Тест-реакция термотаксиса проявилась во всех опытах.

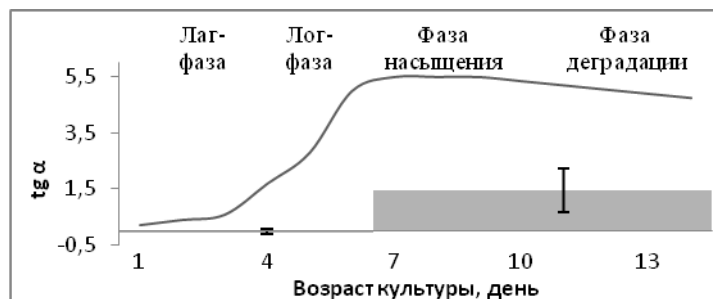


Рис. 4. Исследование влияния возраста культуры на термотаксическую реакцию.

Результаты оценки влияния исходной концентрации инфузорий на выраженность реакции термотаксиса представлены на рис. 5. В качестве анализируемых концентраций были выбраны следующие: 500, 1000, 1500, 2000 и 3000 кл/мл. Повторяемость опытов составляла 5 раз. Максимум реакции термотаксиса для всех концентраций наиболее наблюдается в диапазоне 60...90 с (рис. 5 а) и возрастает с увеличением концентрации взвеси (рис. 5 б).

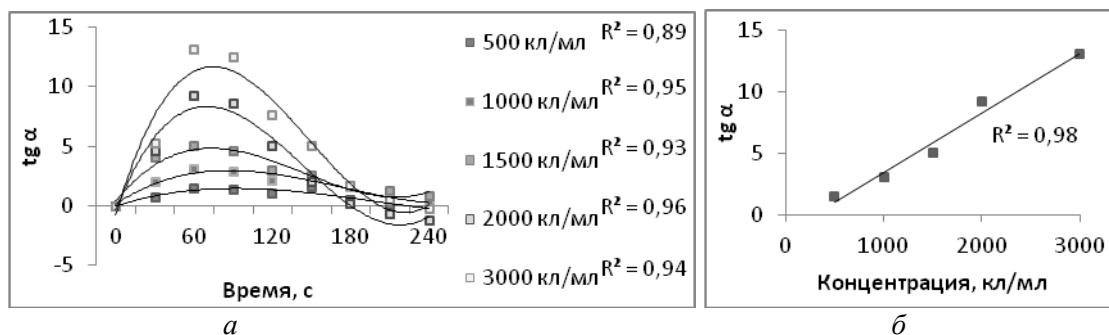


Рис. 5. Исследование влияния исходной концентрации взвеси на термотаксическую реакцию инфузорий.

В четвертой главе были изучены биотехнические факторы, а именно исследовано влияние на термотаксическую реакцию модельных токсикантов, исходной концентрации взвеси инфузорий, возраста культуры, а также схема формирования реакции и физическим методам протекания термотаксиса. В результате проведенных исследований можно дать рекомендации по получению тест-реакции термотаксиса: возраст инфузорий должен составлять 7 дней, а концентрация должна быть $2500 \pm 20\%$ кл/мл.

Третья глава посвящена разработке дискретной рекуррентной математической модели температурных популяционных реакций инфузорий, отражающей формирование распределения количества клеток в кювете как зависимость последующих значений от предыдущих.

При построении линейной рекуррентной клеточной модели было принято, что зона перемещения популяции инфузорий состоит из n ячеек, в которых первоначально находится одинаковое количество частиц (N_{zk} – количество частиц в ячейке z при отсчете k), что моделирует равномерное распределение организмов в узкой протяженной кювете. Частицы (моделирующие инфузорий) могут перемещаться из одних ячеек в другие через каждый отсчет времени, причем суммарное количество частиц остается постоянным. Значения коэффициентов перехода в ячейках β_{ij} , которые переходят из ячейки i в ячейку j при движении популяции (табл. 1), и их знаки определяют скорость и направление движения частиц из одной ячейки в другую.

Таблица 1.

Описание модели

№ ячейки	Математическое описание процесса перераспределения инфузорий по кювете
1.	$N_{11} - \beta_{12}N_{11} + \beta_{21}N_{21} = N_{12}$
2...7.	$N_{z,1} + \beta_{z-1,z}N_{z-1,1} - \beta_{z,z-1}N_{z,1} - \beta_{z,z+1}N_{z,1} + \beta_{z+1,z}N_{z+1,1} = N_{z,2}$
8.	$N_{81} + \beta_{78}N_{81} - \beta_{87}N_{81} = N_{82}$
	$\sum N_{ik} = \text{Const}$

Разработанная математическая модель популяционных реакций одноклеточных позволила моделировать ненаправленное, одностороннее (рис. 7) и двустороннее направленное движение организмов.

При моделировании одностороннего движения частиц при зоне комфортной температуры в крайней ячейке (рис. 6) коэффициенты перехода частиц из ячеек имеют значения $\beta_{ij} \neq \beta_{ji}$. В зависимости от того β_{ij} больше или меньше β_{ji} , изменяется направление движения. Корреляция между результатами эксперимента и моделью составила 0,91 (β_{ij} среднее=0,5 и СКО=0,001; β_{ji} среднее=0,2 и СКО=0,001).

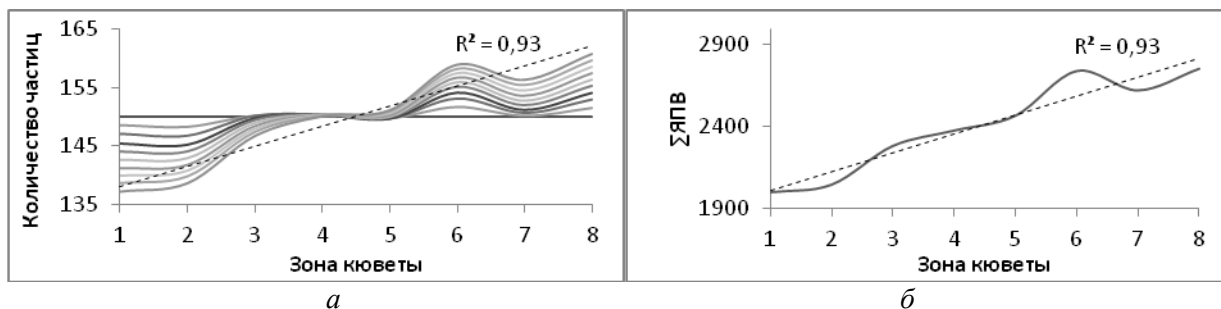


Рис. 6. Распределения частиц при движении в зону 8 (а) и яркостей пикселей снимка слоя инфузорий в кювете $40 \times 5 \times 10$ мм при зоне комфортной температуры справа.

Разработанная модель позволила анализировать как за счет изменения коэффициентов перехода групп одноклеточных организмов из одной зоны в другую меняется распределение количества клеток по кювете. Было показано, что для распределений популяции *P. caudatum* при термотаксисе, полученных после цифровой обработки его снимков, моделирование позволяет получить с коэффициентом корреляции $r = 0,91 \dots 0,94$ полиномы, описывающие распределение частиц по ячейкам, за счет подбора коэффициентов перехода частиц из ячеек.

Для того, чтобы получить возможность при исследовании термотаксиса опираться на результаты эксперимента, также описаны методы преобразования данных, полученных с помощью цифровых изображений термотаксиса в коэффициенты модели. Для описания реальных сигналов можно использовать только одну группу коэффициентов.

Решая обратную задачу: получение формулы для коэффициентов модели по количеству клеток в ячейках при последовательных отсчетах, была выведена обобщенная формула для коэффициентов, имеющая следующий вид:

$$\beta_{pij} = \sum_{i=1}^p \frac{N_{i(j-1)} - N_{ij}}{N_{i(j-1)}}$$

Коэффициенты перехода рассчитываются на основе значений количества клеток в предыдущей, последующей и ячейке, для которой рассчитывается коэффициент перехода β . Расчет этих коэффициентов по реальным данным позволил восстанавливать графики изменения количества клеток в ячейках и получать функции изменения значений коэффициентов от номера ячейки кюветы (рис. 7).

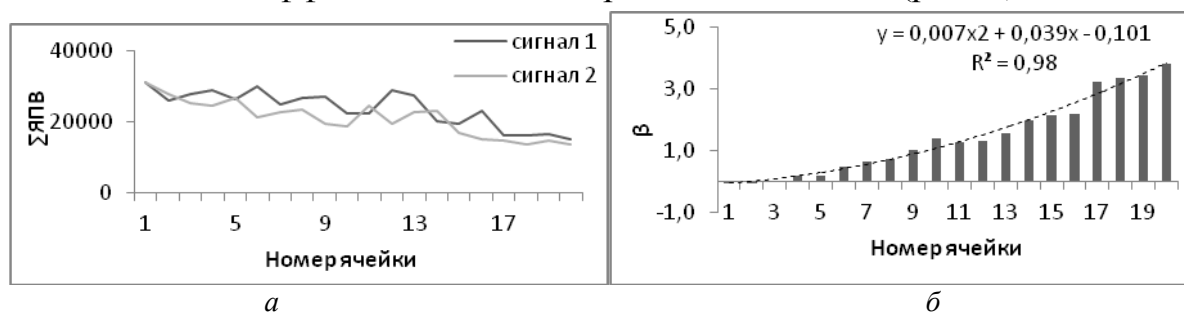


Рис. 7. Графики последовательных пар сигналов при термотаксисе (а) и графики коэффициентов перехода (б), которые рассчитываются по значениям сигналов ($\Sigma ЯПВ$ - суммы яркостей пикселей вертикальных).

При анализе коэффициентов модели выделяются фазы развития и угасания термотаксиса в условиях нестабильного градиента температуры. Наиболее ценно обнаружение изменения знака коэффициентов при термотаксисе, что может быть количественной оценкой этой реакции.

Данный метод может быть применен к исследованию целой группы таксисов простейших и бактерий.

В четвертой главе приводятся алгоритмы разработанных программного обеспечения (ПО), (табл. 2): применения программы ELCUT для моделирования термодинамических процессов, происходящих в кювете при одностороннем воздействии низких температур; ПО для реализации модели ненаправленного и направленного движения организмов по узкой протяженной кювете; ПО для определения линейного тренда популяционного распределения инфузорий по кювете; ПО для определения информативных параметров термотаксической реакции инфузорий, в качестве которых выступают коэффициенты перехода по разработанной математической имитационной рекуррентной модели и градиент наклона линейного тренда популяционного распределения инфузорий по узкой протяженной кювете; ПО для определения средней концентрации в объеме кюветы.

Таблица 2.

Основные параметры разработанных программ

№	Блок	Функции	Параметры
1.	моделирования термодинамических процессов при одностороннем воздействии низких температур (в среде ELCUT)	<ul style="list-style-type: none"> решения задачи моделирования термодинамических процессов 	исходные данные - теплопроводность воды, охладителя и материалов стекла кюветы и металлов
2.	реализации модели ненаправленного и направленного движения организмов (в среде MATLAB)	<ul style="list-style-type: none"> ввода значений прямых и обратных коэффициентов перехода; ввода оптимальной температуры; ввода количества отсчетов; расчета количества отсчетов при каждом отсчете в каждой ячейке; построения графика ненаправленного и направленного движения организмов. 	исходные данные - прямые и обратные коэффициенты перехода.
3.	определения линейного тренда популяционного распределения инфузорий (в среде MATLAB)	<ul style="list-style-type: none"> загрузки исходного изображения; демонстрации изображения и построения его гистограммы; обработки данных методом скользящего среднего аппроксимации графика коэффициентов перехода линейным трендом; сохранения данных. 	исходные данные - фотоизображение. скорость обработки - порядка 20 изображений/мин.
4.	определения информативных параметров - коэффициентов перехода по разработанной математической модели с функцией ручной раскодировки (в среде MATLAB)	<ul style="list-style-type: none"> загрузки исходного блока изображений; построения гистограммы; построения графика коэффициентов перехода; аппроксимации графика коэффициентов перехода полиномиальным трендом 3-его порядка и вывод его коэффициентов; сохранения данных. 	исходные данные - блок кадров с шагом раскодировки 30 с., состоящий из 9 фотоизображений скорость обработки - 10 блоков/мин.
5.	определения ин-	<ul style="list-style-type: none"> загрузка исходного видеофайла; 	исходные дан-

	формативных параметров - коэффициентов перехода по разработанной математической модели с функцией автоматической раскодировки (в среде MATLAB)	<ul style="list-style-type: none"> • выбора начального фрагмента видеозаписи; • демонстрации заданного фрагмента видеозаписи; • автоматической раскодировки видеофайлов; • выделения интересующей области кадра; • построения гистограммы; • построения графика коэффициентов перехода; • аппроксимации графика коэффициентов перехода полиномиальным трендом 3-его порядка и вывод его коэффициентов; • сохранения данных. 	ные - видеофайл. скорость обработки - 12 видеозаписей/мин
6.	определения информативных параметров - градиента наклона линейного тренда популяционного распределения инфузорий и определение средней концентрации в объеме кюветы (в среде MATLAB)	<ul style="list-style-type: none"> • загрузки исходных видеофайлов; • выбора начального фрагмента видеозаписи; • демонстрации заданного фрагмента видеозаписи; • автоматической раскодировки видеофайлов; • выделения интересующей области кадра; • построения термотаксической реакции (градиент наклона в зависимости от времени); • построения индикации; • просмотра кадра в введенный момент времени; • расчета максимальной и минимальной точки термотаксической реакции; • сохранения данных. 	исходные данные - видеофайл. скорость обработки - 12 видеозаписей/мин.
7.	комплексной программы для определения информативных параметров таксиса инфузорий	<ul style="list-style-type: none"> • загрузки исходных видеофайлов; • выбора начального фрагмента видеозаписи; • демонстрации заданного фрагмента видеозаписи; • автоматической раскодировки видеофайлов; • выделения интересующей области кадра; • построения термотаксической реакции (градиент наклона в зависимости от времени); • построения индикации; • просмотра кадра в введенный момент времени; • расчета максимальной и минимальной точки термотаксической реакции; • построения гистограммы; • построения графика коэффициентов перехода; • сохранения данных. 	исходные данные - видеофайл. скорость обработки - 12 видеозаписей/мин.

С помощью программы ELCUT была построена модель термодинамических процессов при одностороннем воздействии низких температур (табл. 3).

Таблица 3.

Моделирование термодинамических процессов.

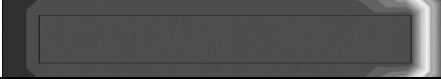




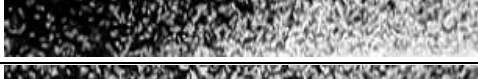

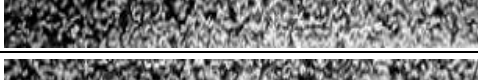


Время, мин	Модель, разработанная в ELCUT	Распределение инфузорий по кювете
0		
1		
2		
3		
4		

Схема программы определения информативных параметров термотаксиса инфузорий, в качестве которых выступают коэффициенты перехода по модели и комплексная программа информативных параметров представлена на рис. 8.



Рис. 8. Общая схема, разработанных программ, реализующих: а - определение коэффициентов перехода по разработанной математической модели; б - комплексную оценку информативных параметров таксических реакций инфузорий.

Схемы и поэтапные алгоритмы разработанных программ, реализованные в интерактивной среде Matlab, представлены в главе 4.

Таким образом, разработанный программный комплекс включает в себя несколько функций, позволяющих проводить цифровую и статистическую обработку данных.

В пятой главе диссертации приведены результаты экспериментальных данных по исследованию тест-реакции термотаксиса.

Разработана структура аппаратно-программного комплекса нового экспресс-биотеста (рис. 9), составными частями которого являются П – проба, Т-О - тест-объект, МП – материалы и принадлежности, ИИ – источник излучения, К – кювета, Т-Р – тест-реакция, БУТ – блок управления температурой, ЦВК – цифровая видеокамера, ПК – персональный компьютер, БЦОИ – блок цифровой обработки изображений, БСОД – блок статистической обработки данных, СОИ – система отображения информации, ОИ – оператор-исследователь.

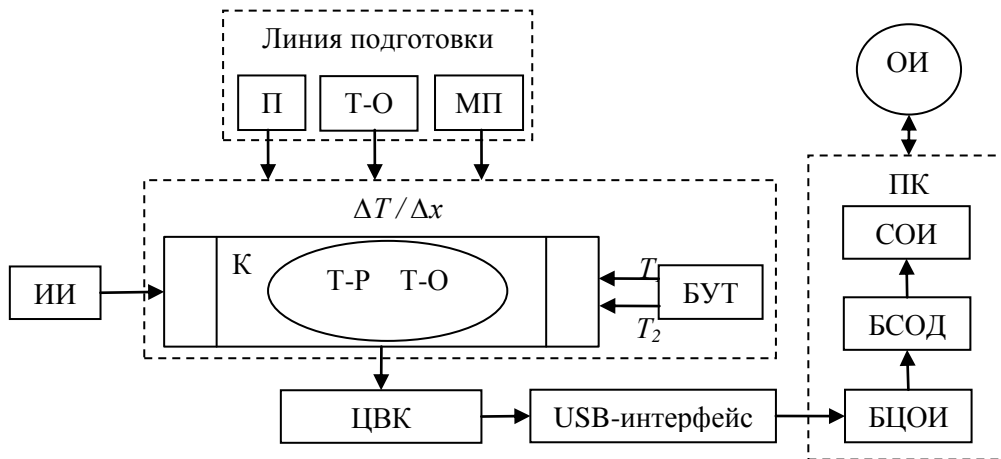


Рис. 9. Структура аппаратно-программного комплекса для биотестового контроля токсичности водных сред на базе тест-реакции термотаксиса *Paramecium caudatum*.

Схема проведения эксперимента включает подготовительные (1 – 3), измерительные (4 – 5) и вычислительные (6 – 10) этапы (рис. 10):

1. Подготовка культуры с рабочей концентрацией $C=2000\pm 20\%$ кл/мл.
2. Разбавление 1 мл взвеси инфузорий 1 мл исследуемой пробой (контролем).
3. Размещение анализируемой (контрольной) кюветы в кюветном модуле.
4. Проведение тест-реакции согласно разработанной методики в течение 10 мин
5. Регистрируется тест-реакции в течение 10 мин.
6. Получение сигналов для исследуемой и контрольной пробы.
7. Вычисление значений градиентов наклона линейного тренда распределения инфузорий по кювете для исследуемой ($\text{tg } \alpha_{\text{исслед.}}$) и контрольной ($\text{tg } \alpha_{\text{контрол.}}$) проб.
8. Вычисление времени (t) точки перегиба градиента наклона для контрольной проб.
9. Нахождение значений градиента наклона в момент t для исследуемой ($\text{tg } \alpha_{\text{исслед.}(t)}$) и контрольной проб ($\text{tg } \alpha_{\text{контрол.}(t)}$).
10. Построение графика зависимости $\text{tg } \alpha_{\text{исслед.}(t)}$ и $\text{tg } \alpha_{\text{контрол.}(t)}$.
11. Анализ результатов.

С помощью разработанного аппаратно-программного комплекса были впервые получены зависимости (рис. 10) информативных параметров термотаксиса от концентрации модельного токсиканта - азида натрия, который является ингибитором клеточного дыхания ($y=-0,98x+3,42$ при $R^2=0,91$).

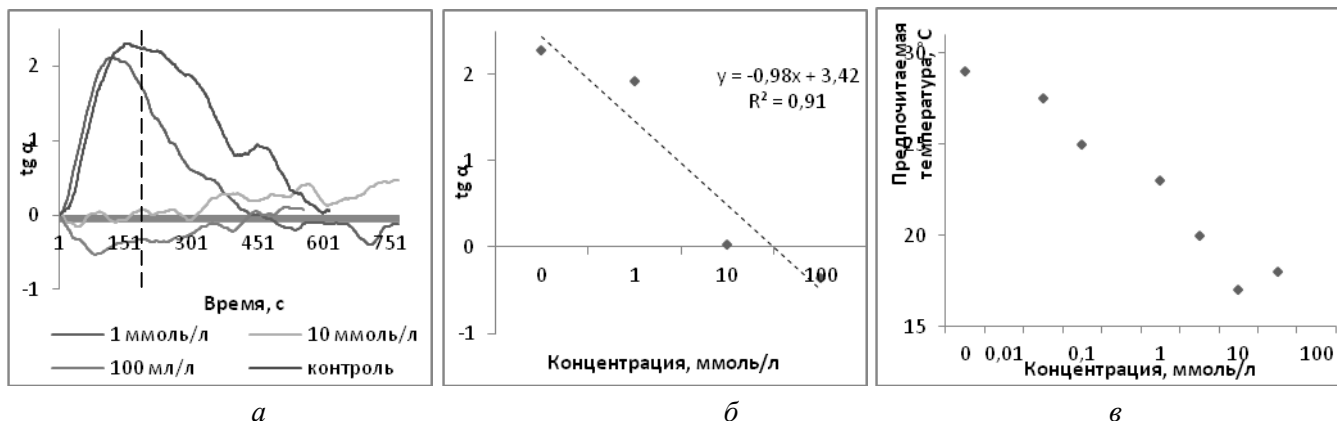


Рис. 10. Исследование воздействия ингибитора клеточного дыхания NaN_3 на термотаксическую реакцию инфузорий (а – результаты цифровой обработки; б - зависимость информативного параметра от концентрации NaN_3 , в – зависимость, полученная по методу Гертера за 60 мин (Малвин Г.М., 1994)).

Зависимости информативных параметров термотаксиса от концентрации модельного токсиканта CuSO_4 , который является ингибитором метаболизма, характеризуется линейной аппроксимацией $y = -0,35x + 1,44$ с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,97$ (рис. 11).

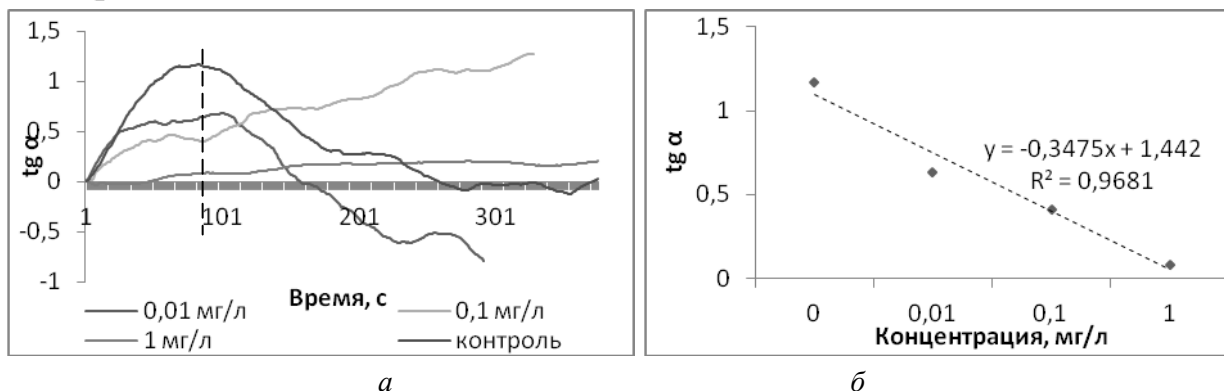


Рис. 11. Исследование воздействия ингибитора метаболизма CuSO_4 на термотаксическую реакцию (а – результаты цифровой обработки; б – зависимость информативного параметра от концентрации CuSO_4).

Методика определения токсичности различных сред, разрабатываемая на базе тест-реакции термотаксис, основана на контроле хемотаксической и термотаксической реакций взвеси инфузорий, т.е. уходе культуры от опасного химического вещества в градиенте температур.

Для определения токсичности водных сред обоснован расчет индекса токсичности:

$$T = \frac{tg \alpha_{\text{контроль}}(t) - tg \alpha_{\text{исслед}}(t)}{tg \alpha_{\text{контроль}}(t)}$$

где $tg \alpha_{\text{исслед}}(t)$ и $tg \alpha_{\text{контроль}}(t)$ – значение градиента наклона популяционного распределения инфузорий в исследуемой и контрольной кюветах соответственно в момент точки перегиба для контрольной пробы t .

Апробация предложенной методики биотестирования была проведена на модельных токсикантах – азиде натрия в концентрациях 1, 10, 100 ммоль/л (рис. 12 а) и сульфате меди в концентрациях 0,01, 0,1 и 1 мг/л (рис. 12 б).

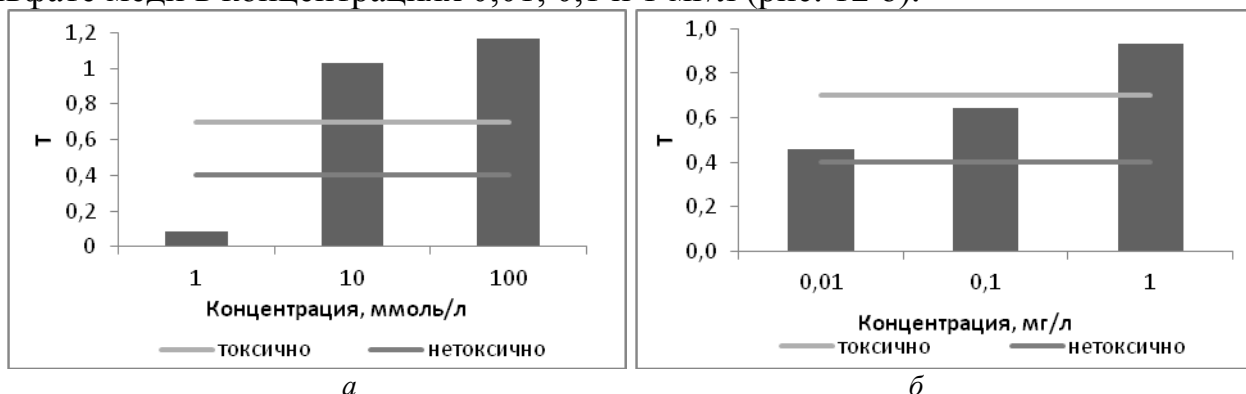


Рис. 12. Зависимость индекса токсичности от концентрации NaN_3 (а) и CuSO_4 (б).

Эксперименты показали возможность использования данного метода для контроля токсичности водных растворов ингибиторов клеточного дыхания.

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

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Осуществлен выбор тест-объекта и тест-реакции для биотестирования водных сред. Показано, что в качестве контролируемой тест-реакции выступает термотаксис инфузорий, на базе которого при мониторинге пресных водных объектов кон-

троль токсичности осуществляется на основе реакции простейших на искусственную гипоксию.

2. Определено новое пространство входных признаков экспресс-биотеста контроля качества водных объектов. Исследовано влияние биологических и физических факторов на реакцию термотаксиса *Paramecium caudatum* и выявлено, что наиболее важную роль играет возраст культуры.
3. Разработана математическая модель, описывающая термотаксис как тест-реакцию на токсичность водной среды и позволяющая выявить процесс самоорганизации инфузорий при термотаксисе.
4. Предложена структура системы контроля качества водных объектов. Разработан аппаратно-программный комплекс контроля тест-реакции, позволивший реализовать экспресс-биотест за 10 мин, а также выработаны критерии оценки тест-реакции термотаксиса. В качестве информативного параметра предложен градиент линейного тренда рассчитанного по распределению популяции инфузорий по кювете.
5. Создан новый вид биотеста на базе термотаксической тест-реакции инфузорий. Разработан макет экспериментальной установки биотеста, реализующий предлагаемый метод, который апробирован на модельных токсикантах NaN_3 и CuSO_4 .

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Издания, рекомендованные ВАК России:

1. **Величко А.Н.**, Ковалевская А.С., Смолова О.В. Биотехническая система для исследования параметров движения инфузорий. // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ» (Известия государственного электротехнического университета). – 2010. – №7. – С.97-101.
2. **Величко А.Н.**, Захаров И.С. Исследование методов формирования тест-реакции термотаксиса инфузорий // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ» (Известия государственного электротехнического университета), Сер. Биотехнические системы в медицине и экологии. – 2014. – №1. – С.69-73.
3. **Величко А.Н.**, Захаров И.С., Кустов Т.В. Исследование биотехнологических факторов биотеста на базе термотаксиса инфузорий для контроля токсичности водных сред // Биотехносфера. – 2014. – №5. – С. 8-12.
4. **Величко А.Н.**, Захаров И.С. Исследование токсичности вредных веществ, обусловленной термодиффузией в стратифицированной водной среде. // Биотехносфера. – 2014. – №5. – С.35-37.
5. **Величко А.Н.** Анализ результатов исследования реакции термотаксиса *Paramecium caudatum*. // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ» (Известия государственного электротехнического университета). – 2016. – №4. – С.50-56.
6. **Величко А.Н.**, Трофимова В.С., Завгородний А.В. Исследование влияние возраста культуры на тест-реакцию термотаксиса *Paramecium caudatum*. // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ» (Известия государственного электротехнического университета). – 2016. – №9. – в печати.

Другие статьи и материалы конференций:

Ниже представлен перечень наиболее значимых публикаций.

7. **Величко А.Н.**, Ковалевская А.С. Биотехнические методы исследования температурных реакций инфузорий. // Сборник научных работ участников международного молодежного конкурса «Студент и научно-технический прогресс». – г. Таганрог, 2012. – №2. – С.35-39.
8. **Величко А.Н.**, Захаров И.С. Исследование возможности применения температурных популяционных реакций инфузорий как информативных показателей вредных факторов в среде // Мате-

- риалы конференции VIII Санкт-Петербургской межрегиональной конференция «Информационная безопасность регионов России (ИБРР-2013)». – г. Санкт-Петербург, 2013. – С.215-216.
9. **Velichko A.N., Zakharov I.S.** Investigation of the propagation model toxicant in a stratified water environment // International youth science environmental forum of Baltic region countries "EcoBaltica'2013": Book of Proceedings. SPb: Publishing house of the Polytechnical University, 2013. P. 149.
 10. **Величко А.Н., Захаров И.С.** Математическое моделирование температурных популяционных реакций одноклеточных // Сборник статей по материалам XIII международной научно-практической конференции № 12 (12) «Естественные и математические науки в современном мире». – Новосибирск: Изд. «СибАК», 2013. – С.162-168.
 11. **Величко А.Н., Захаров И.С.,** Перевод регистрируемых сигналов, полученных при термотаксисе инфузорий, в параметры математической модели // Сборник статей по материалам XXXI международной научно-практической конференции «Технические науки – от теории к практике». – г. Новосибирск: СибАК, 2014. – С. 182-190.
 12. **Величко А.Н., Куликова Ю.В., Захаров И.С., Кустов Т.В.** Алгоритм и программа математической модели биотестовой реакции термотаксиса инфузорий // Сборник докладов II научно-технической конференции с международным участием «Наноиндустрия и технологии будущего» для студентов, аспирантов и молодых ученых». – г. Санкт-Петербург, 2014.
 13. **Величко А.Н., Сутырина Е.Р., Трофимова В.С., Захаров И.С., Кустов Т.В.** Разработка алгоритма обработки цифровых изображений биотестовых реакций инфузорий // Сборник докладов II научно-технической конференции с международным участием «Наноиндустрия и технологии будущего» для студентов, аспирантов и молодых ученых. – г. Санкт-Петербург, 2014.
 14. **Величко А.Н., Захаров И.С., Сутырина Е.Р., Куликова Ю.В., Трофимова В.С., Трушкова Ю.Л.** Программа расчета информативных параметров биотестовой реакции термотаксиса инфузорий //Сборник докладов всероссийской конференции «Биотехнологии в интересах экологии и экономики Сибири и Дальнего Востока». – г. Улан-Удэ, 2014. – С. 38-40.
 15. **Velichko A.N., Zakharov I.S.** The instrument study bioassay methods of soil extracts // Материалы международной молодежной школы «Технологии биотестирования в экологической оценке агроценозов и гуминовых кислот» при МГУ имени М.В. Ломоносова. – г. Москва, 2014. – С. 164-165.
 16. **Величко А.Н., Захаров И.С.** Актуальность создания БТС на базе тест-реакции термотаксиса *Paramecium caudatum* для контроля токсичности водных сред //Материалы VI молодежного экологического конгресса «Северная пальмира». – г. Санкт-Петербург, 2014. – С. 42-46.
 17. **Величко А.Н., Захаров И.С.** Система контроля тест-реакции термотаксиса *Paramecium caudatum* // Сборник докладов III научно-технической конференции с международным участием «Наука настоящего и будущего». – г. Санкт-Петербург, 2015. – С. 93-95.
 18. **Величко А.Н., Захаров И.С., Кустов Т.В., Филатов Ю.В.** Биотехническая система на базе тест-реакции термотаксиса *Paramecium caudatum* для контроля токсичности водных сред // Сборник докладов XVIII международной конференции по мягким вычислениям и измерениям (SCM'2015). – г. Санкт-Петербург: Изд-во СПбГЭТУ "ЛЭТИ", 2015. – С. 263-266.
 19. **Величко А.Н., Захаров И.С.** Программная часть системы контроля термотаксических реакций простейших // Сборник докладов IX Санкт-Петербургской межрегиональной конференции «Информационная безопасность регионов России (ИБРР-2015)». – г. Санкт-Петербург, 2015. – С. 164-165.
 20. **Velichko A., Zakharov I., Zavgorodniy A.** Bioengineering systems for *P. caudatum* thermotaxis test reaction study // Сборник докладов международной конференции молодых исследователей в области электротехники и электроники (2016 ElConRusNW). – г. Санкт-Петербург, 2016.