

***Климов Ю. С., Павлов В. И., Кулакова С. И.**

Донбасский государственный технический университет

**E-mail: klimov.bio@gmail.com*

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ВОД ДОНБАССА

Представлена методика проведения 21-дневного хронического биотестирования с использованием *Daphnia magna* Straus для интегральной оценки токсичности природных вод Донбасса, загрязненных тяжелыми металлами. Методика учитывает проблемы генетической неоднородности популяций, предлагая подход к селекции чувствительных генотипов. Описаны условия теста, процедура создания чувствительной тест-линии, исследуемые параметры (длина тела, длина хвостовой иглы, плодовитость, абортивные яйца, характер движений, наполнение кишечника, ЧСС, вариабельность ритма), протокол анализа данных в ImageJ, ключевые токсикологические показатели (NOEC, LOEC, EC_{50/20/10}) и статистическая обработка. Разработанная методика позволяет регистрировать сублетальные эффекты при концентрациях токсикантов на несколько порядков ниже летальных, что повышает диагностическую ценность биотестирования. Приведены критерии валидности теста и ожидаемые результаты.

Ключевые слова: *Daphnia magna*, хроническое исследование, биотестирование, тяжелые металлы, селекция чувствительных генотипов, сублетальные эффекты, частота сердечных сокращений, кардиотоксичность, морфометрический анализ, абортивные яйца, эмбриотоксичность.

Проблема и её связь с научными и практическими задачами. Проблема загрязнения поверхностных водных источников тяжелыми металлами (ТМ) приобретает особую остроту в регионах с интенсивной историей горнодобывающей промышленности. На территории восточного Донбасса закрытие угольных шахт и последующее затопление выработанных пространств привело к активизации гидрохимических процессов, в результате которых в речную сеть поступают растворимые соли ТМ и токсических микроэлементов. Это создает реальные риски угнетения водных экосистем и распространения токсичности по трофической цепи [1].

В этих условиях химический анализ, являясь основным методом оценки качества воды, часто оказывается недостаточным, поскольку он лишь констатирует наличие или отсутствие определенных химических элементов в пробе, но не позволяет оценить их комбинированное воздействие на живые организмы [2]. Наиболее эффективным инструментом для инте-

гральной оценки токсичности природных вод является биотестирование с использованием чувствительных тест-организмов, среди которых широкое признание получил планктонный рачок *Daphnia magna* Straus (*Daphnia magna*).

Daphnia magna является типичным представителем зоопланктона малых рек и рекомендуется в качестве базового организма для биотестирования благодаря ряду преимуществ: фильтрационный тип питания, хорошо развитые кровеносная и нервная системы, что позволяет с определенной долей достоверности экстраполировать результаты токсикологических исследований на других многоклеточных представителей экосистем [3].

Однако основополагающей проблемой биотестирования является обеспечение достаточно высокой и, главное, одинаковой физиологической чувствительности тест-организмов. Существующие стандартизированные методики (например, ГОСТ Р 56236-2014, РД 52.24.868-2017) предусматривают использование синхро-

низированных культур. Тем не менее, анализ литературных данных [4–7], в частности, исследований Иркутского государственного университета и Лимнологического института СО РАН, показывает, что даже в одной природной популяции могут присутствовать особи с различной генотипической структурой и, следовательно, с разной морфофизиологической реакцией на ухудшение качества среды обитания.

Более того, длительное культивирование синхронизированной популяции, полученной от одного генотипа, может приводить к снижению ее исходной чувствительности к токсикантам [8]. Эти факторы вносят неопределенность в результаты биотестирования и требуют разработки дополнительных методических приемов для подготовки тест-культур.

Особую сложность представляет оценка хронического токсического действия вод малых рек восточного Донбасса. Многие тяжелые металлы даже в концентрациях, не вызывающих острой гибели (ниже ПДКв), способны подавлять репродуктивную функцию, фильтрационную активность и влиять на рост дафний [1, 9, 10]. При хроническом воздействии на первый план выходят эффекты биоаккумуляции, мутагенности и функциональной кумуляции, а также синергетические и антагонистические взаимодействия микроэлементов в шахтной воде, которые невозможно выявить в краткосрочных тестах на летальность [1].

Таким образом, возникает необходимость в разработке детализированной методики проведения хронического исследования по *Daphnia magna*, которая учитывала бы не только стандартные требования к выживаемости и репродуктивной способности, но и включала бы методические решения для:

- формирования тест-популяции с гарантированно высокой и одинаковой чувствительностью;
- контроля возможного дрейфа чувствительности в процессе длительного культивирования;

- оценки сублетальных эффектов (биоаккумуляция, влияние на плодовитость, кардиоваскулярные нарушения), которые критически важны для адекватной оценки экологического риска для гидроэкосистем малых рек.

Постановка задачи. Цель настоящей методики — структурированное описание процедуры проведения 21-дневного хронического эксперимента с *Daphnia magna*, направленного на оценку хронического токсического действия воды малых рек восточного Донбасса (или модельных растворов тяжёлых металлов) на выживаемость, репродуктивную способность, морфометрические показатели и кардиоваскулярную функцию *Daphnia magna* с использованием тест-линии, предварительно охарактеризованной по уровню максимальной физиологической чувствительности.

Задачи исследования:

1. Обосновать необходимость комплексного подхода к оценке хронического токсического воздействия тяжелых металлов на *Daphnia magna* с учётом региональной специфики малых рек восточного Донбасса.
2. Систематизировать современные методические подходы к формированию тест-культур с заданным уровнем чувствительности (генотипический отбор, селекция чувствительных линий).
3. Разработать протокол регистрации и анализа морфометрических, репродуктивных и кардиоваскулярных показателей *Daphnia magna* при помощи микроскопии с использованием программного обеспечения ImageJ.
4. Представить детализированное описание этапов проведения хронического эксперимента с указанием условий культивирования, критериев валидности и методов статистической обработки.
5. Охарактеризовать диагностическую значимость различных тест-функций (выживаемость, плодовитость, наличие абортных яиц, частота сердечных сокращений, морфометрические параметры) для

оценки сублетальных эффектов хронического загрязнения.

Объект исследования — процесс хронического биотестирования водных сред с использованием тест-культуры *Daphnia magna*, полученной из природных популяций малых рек восточного Донбасса

Предмет исследования — комплекс методических приемов и тест-функций (морфометрических, репродуктивных, кардиоваскулярных) для оценки хронического токсического воздействия ТМ на *Daphnia magna*, включая процедуры генотипического отбора, видеорегистрации и анализа изображений в программе ImageJ.

Методы исследования. В токсикологических исследованиях традиционно выделяют два основных подхода: острый (краткосрочный) и хронический (длительный) эксперименты. Острые тесты, продолжительностью обычно 24–48 (до 96) часов, направлены на оценку летальных эффектов — гибели организмов в условиях высоких концентраций токсиканта и позволяют рассчитать ЛК₅₀ (полулетальную концентрацию).

Хронический эксперимент предполагает длительное (21 день и более) воздействие на тест-организмы в диапазоне сублетальных концентраций. Это даёт возможность оценить не только выживаемость, но и интегральные показатели, такие как репродуктивная функция, физиологический статус и поведенческие реакции. Хронический тест считается более информативным для целей экологического нормирования, поскольку позволяет выявить эффекты при концентрациях, близких к реально встречающимся в природных водах.

Ниже представлено детальное описание этапов предлагаемой методики хронического биотестирования с использованием предварительно селекционированной тест-линии *Daphnia magna*.

1. Создание тест-линии *Daphnia Magna* Straus с повышенной чувствительностью к тяжёлым металлам. Данный этап биотестирования является

ключевым, поскольку чувствительность тест-объекта к токсическим веществам в значительной степени определяется его генетическими особенностями. Согласно данным [11–13], природные популяции дафний характеризуются выраженной генетической неоднородностью, проявляющейся в фенотипической пластичности количественных физиологических признаков. Это позволяет рассматривать каждую партеногенетическую линию как отдельный генотип с уникальной функциональной реакцией на стрессовые факторы.

В основе формирования чувствительной тест-линии необходимо использовать клональный подход, основанный на способности *Daphnia magna* к партеногенетическому размножению, при котором потомство является генетически идентичным материнской особи. Такой подход обеспечивает генетическую стабильность линии и позволяет фиксировать наследуемые различия по физиологической чувствительности к воздействию токсикантов, в том числе ТМ (Cd, Cu, Zn, Pb).

Важным условием методики является разграничение наследуемой чувствительности и временного физиологического ослабления. Для этого предусмотрен этап восстановления в чистой среде и подтверждение стабильности признака в нескольких поколениях без экспозиции.

Изложение материала. 1.1. Получение исходного генофонда. Исходным материалом служат половозрелые самки *Daphnia magna*, отобранные из природных популяций водоемов малых рек восточного Донбасса (не менее 5–8 географически удаленных точек для обеспечения максимального генетического разнообразия).

Минимальный объем выборки на данном этапе должен составлять не менее 50–100 особей для сохранения репрезентативности исходного генофонда.

После отбора рачки культивируются в стандартных лабораторных условиях не менее двух поколений без воздействия ТМ. Это позволяет минимизировать влия-

ние предшествующих экологических факторов на результаты селекции.

1.2. *Выбор концентрации и экспозиция в щадящем режиме для выявления чувствительности.* Для выявления генотипических различий используется хронический сублетальный стресс, который, что принципиально важно, не должен вызывать массовой гибели, поскольку селекция на основе высокой смертности приводит к отбору устойчивых форм. В данной методике выявление наиболее чувствительных особей проводится на основе различий в сублетальных показателях.

1.2.1. *Выбор концентрации.* Предварительно определяется концентрация, близкая к NOEC или EC₁₀, на стандартной лабораторной культуре. Концентрация должна:

- не вызывать массовой гибели (смертность не более 10–15 %);
- снижать плодовитость или замедлять развитие у части особей;
- обеспечивать выявление вариабельности реакции.

Использование диапазона EC₁₀–EC₂₀ предпочтительнее, чем ориентирование на NOEC, поскольку данный интервал более чувствителен к сублетальным эффектам.

1.2.2. *Химические свойства металлов.* Различные металлы имеют неодинаковую токсичность для дафний. В таблице 1 приведены ориентировочные диапазоны для наиболее распространенных тяжелых металлов [1, 9, 13].

1.2.3. *Факторы, повышающие чувствительность.* Для усиления эффекта рекомендуется использовать мягкую воду (жесткость менее 50 мг CaCO₃/л), поскольку доказано, что низкая жесткость воды повышает биодоступность и токсичность металлов для дафний в 2–3 раза [13, 14].

1.3. *Изоляция и размножение чувствительных линий.* На данном этапе осуществляется отделение генотипов, проявивших наибольшую выраженность сублетальных эффектов при сохранении способности к размножению.

Таблица 1
Ориентировочные концентрации для селекции
(на основе литературных данных)

Металл	Концентрация в мг/дм ³
Cd	(NOEC) 0,00017–0,0005 мг/дм ³
	(LOEC) 0,001–0,003 мг/дм ³
	(рабочая) 0,0003–0,0008 мг/дм ³
Cu	(NOEC) 0,005–0,01 мг/дм ³
	(LOEC) 0,015–0,03 мг/дм ³
	(рабочая) 0,008–0,015 мг/дм ³
Zn	(NOEC) 0,03–0,07 мг/дм ³
	(LOEC) 0,1–0,2 мг/дм ³
	(рабочая) 0,05–0,08 мг/дм ³
Pb	(NOEC) 0,01–0,03 мг/дм ³
	(LOEC) 0,04–0,08 мг/дм ³
	(рабочая) 0,02–0,035 мг/дм ³
Ni	(NOEC) 0,01–0,03 мг/дм ³
	(LOEC) 0,04–0,1 мг/дм ³
	(рабочая) 0,02–0,04 мг/дм ³

Примечание: значения могут существенно варьировать в зависимости от жесткости воды, pH и других факторов.

Важно подчеркнуть, что отбор осуществляется не по факту гибели, а по устойчиво проявляющимся сниженным жизненным показателям.

1.3.1. *Перевод в индивидуальные сосуды.* После 1–2 поколений культивирования в присутствии низкой концентрации металла (этап 1.2) отбирают не менее 10–20 взрослых самок и рассаживают их по индивидуальным сосудам в чистую среду без ТМ [8].

Этот этап необходим для исключения прямого токсического воздействия; выявления наследуемости признака; устранения кратковременных физиологических нарушений.

1.3.2. *Оценка жизненных показателей.* В чистой среде проводится оценка каждой клональной линии по ключевым параметрам: выживаемость; плодовитость (общее количество потомства за 21 день); время появления первого помета; длина тела.

Сохранение пониженных показателей по сравнению со средним популяционным уровнем после этапа восстановления свидетельствует о вероятной генетической

обусловленности повышенной чувствительности.

1.3.3. Критерий отбора. Для дальнейшей работы отбираются линии, показавшие в предыдущем поколении (в присутствии ТМ) наихудшие результаты: самую низкую плодовитость или наиболее выраженные отклонения в развитии.

Отбор проводится при условии поддержания достаточной численности клона (не менее 15–20 особей), чтобы исключить и инбридинговую депрессию.

1.4. Консолидация признака и подтверждение чувствительности.

1.4.1. Направленное размножение. Потомство (неониды) от отобранных «чувствительных» линий повторно помещается в среду с низкой концентрацией ТМ (как на этапе 1.2). Цикл «экспозиция → изоляция в чистую среду → отбор по наихудшим показателям» повторяется в течение 3–5 поколений для закрепления признака повышенной чувствительности, что достаточно для консолидации полигенно обусловленных признаков [15].

Признак считается закреплённым, если:

- реакция линии на металл статистически воспроизводима;
- чувствительность сохраняется после поколения без воздействия;
- различия по сравнению с исходной популяцией стабильны.

Важно избегать повышения концентрации ТМ в процессе селекции, чтобы не запустить адаптивный отбор устойчивости.

1.4.2. Финальное тестирование. Объем выборки должен составлять не менее 10–15 особей на каждую тестируемую линию и концентрацию. Проводится стандартный хронический тест с металлом при параллельном тестировании:

- новой селекционированной «чувствительной» линии;
- исходной гетерогенной популяции (контроль);
- стандартной лабораторной культуры (контроль).

Сравниваются значения EC_{10} и EC_{20} (предпочтительно для хронического теста), NOEC/LOEC.

Селекция считается успешной при статистически достоверном снижении EC_{10}/EC_{20} и LOEC у новой линии по сравнению с контрольной ($p < 0,05$).

1.4.3. Контроль стабильности признака. В процессе культивирования селекционированной линии рекомендуется ежеквартально проводить калибровку чувствительности на эталонном токсиканте ($K_2Cr_2O_7$) для своевременного выявления возможного дрейфа чувствительности [16]. При обнаружении снижения чувствительности более чем на 20 % от исходных значений следует повторить цикл селекции.

2. Оборудование и условия проведения теста. Для проведения хронического исследования требуется комплекс оборудования, обеспечивающий стандартизированные условия культивирования, регистрацию и последующую обработку полученных данных [17]:

- микроскоп, оснащённый цифровой камерой для видеорегистрации;
- климатическая камера с точностью поддержания температуры ± 1 °С;
- осветители с таймером, рН-метр, оксиметр;
- химически инертная посуда для культивирования (объём 50–250 мл), фильтры мембранные (0,45 мкм), предметные стекла;
- компьютер с установленным ПО ImageJ.

Для минимизации влияния факторов среды и выявления генотипически обусловленных различий все клональные линии содержатся в одинаковых условиях согласно ФР 1.39.2007.03222 (табл. 2).

3. Выбор исследуемых параметров для исследования при микроскопии. В качестве исследуемых параметров были выбраны показатели, доступные для прямого наблюдения и количественной либо полуколичественной оценки без применения дополнительных методов фиксации окрашивания.

Таблица 2

Условия проведения теста согласно ФР [18]

Параметр	Условие проведения
Тип теста	Полустатический (с возобновлением среды 3 раза в неделю)
Длительность	21 день
Температура	20 ± 1 °С (строгий контроль для исключения температурного влияния на ЧСС [20])
Освещение	16 часов света / 8 часов темноты
Среда	Для контроля — синтетическая среда (по OECD). Для тестовых растворов — натуральная вода из малых рек восточного Донбасса (после фильтрации) или модельные растворы солей ТМ
Кормление	Ежедневное кормление водорослями (<i>Chlorella vulgaris</i>) в стандартизированном количестве (0,1–0,2 мг особь/день)
Плотность посадки	Индивидуальное содержание (1 особь на 50 мл среды) или групповое (не более 20–25 особей на 1 л)

При увеличении ×30–40 отчётливо визуализируются основные анатомические структуры *Daphnia magna* размером от 0,1 до 0,2 мм (рис. 1). Этого вполне достаточно для регистрации морфологических и функциональных изменений, возникающих в ответ на воздействие ТМ в водной среде.

Таким образом, использование микроскопа с увеличением ×40 определяет выбор морфофизиологических показателей, ориентированных на выявление сублетальных токсических эффектов, позволяя связать наблюдаемые изменения в организме *Daphnia magna* с воздействием ТМ, присутствующих в исследуемых водных пробах.

Ниже представлена характеристика выбранных параметров, обоснованная с учётом данных литературы.

3.1. Морфометрические показатели. Морфологические признаки, такие как длина тела, высота головного шлема и длина хвостовой иглы (рис. 2), формиру-

ются в процессе постэмбрионального развития и зависят от интенсивности обменных процессов, скорости линек и состояния кальциевого обмена. Поскольку тяжёлые металлы нарушают ферментативную активность, ионный баланс и метаболизм, их хроническое воздействие неизбежно сказывается на ростовых процессах.

3.1.1. Длина тела рассматривается как основной морфометрический показатель хронической токсичности (измеряется от переднего края головы до основания хвостовой иглы). Длина тела является интегральным показателем благополучия особи. Согласно наблюдениям А. С. Ольковой [16, 17], её одновременное уменьшение в сочетании с бледной окраской свидетельствует об отклонении абиотических или биотических факторов от оптимальных значений. В условиях хронического токсического воздействия ТМ замедление линейного роста служит надёжным критерием угнетения обменных процессов.



Рисунок 1 — *Daphnia magna* при увеличении ×30–40

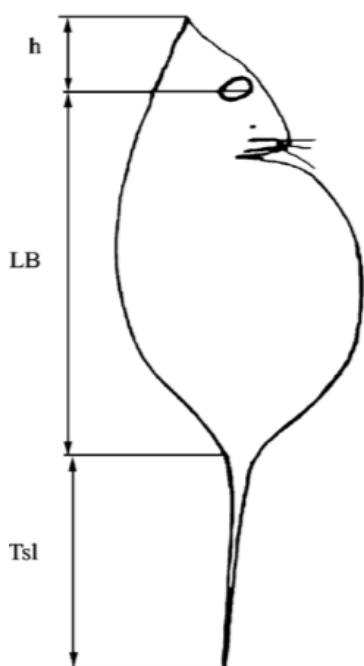


Рисунок 2 — Схема промеров для *Daphnia magna* : LB — длина тела; h — высота шлема; Tsl — длина хвостовой иглы

3.1.2. Длина хвостовой иглы представляет интерес не только как ростовой параметр, но и как потенциальный маркер генотипической изменчивости. В исследованиях, посвященных адаптации дафний к условиям окружающей среды, этот признак используется для выделения различных генотипов внутри популяции на основе корреляции с физиологическими реакциями [4, 5].

Изменение длины иглы в ответ на хронический стресс может отражать как непосредственное токсическое действие (нарушение кальциевого обмена при линьке), так и реакцию организма на акклиматизацию.

3.1.3. Высота головного шлема характеризует особенности морфогенеза и пластичность фенотипа. Данный параметр чувствителен к изменениям среды и может изменяться при длительном токсическом воздействии. Высота шлема рассматривается как дополнительный индикатор, поскольку показатель обладает выраженной зависимостью от температуры, плотности культуры и генотипических особенностей линии.

3.2. Физиологические показатели репродуктивной функции. Репродуктивная функция является одной из самых чувствительных к хроническому воздействию токсикантов. При увеличении $\times 40$ становится возможным прямой подсчет следующих показателей, рекомендованных [16] для оценки «здоровья» тест-культуры.

3.2.1. Количество эмбрионов в выводковой камере. Прямой подсчет яиц и эмбрионов у живых самок позволяет на ранних этапах выявить снижение репродуктивного потенциала до того, как это скажется на общем количестве появившейся молоди.

3.2.2. Наличие и количество abortивных (неразвившихся) яиц. Это один из ключевых и наиболее информативных параметров. Abortивные яйца представляют собой темные сферы диаметром 0,1–0,2 мм, различимые даже невооруженным глазом, а под микроскопом — особенно четко (рис. 3).

Регулярное появление abortивных яиц в опытных группах по сравнению с контролем является прямым доказательством эмбриотоксического эффекта исследуемой воды, вызванного ТМ. Количество abortивных яиц, превышающее 20 % от суммарного числа молоди, свидетельствует о резком ухудшении состояния лабораторной популяции.



Рисунок 3 — Появление abortивных яиц в культуре *Daphnia magna*

3.3. Поведенческие и витальные показатели. Двигательная активность и общее состояние организма, оцениваемые визуально, служат ранними индикаторами стресса, позволяющими зарегистрировать токсический эффект задолго до появления необратимых изменений на морфологическом или репродуктивном уровне. Поведенческие реакции являются наиболее чувствительными и быстро реализуемыми, что делает их ценным инструментом для экспресс-диагностики.

3.3.1. Характер движений и локомоторная активность. Отклонением от нормы считаются слишком резкие спонтанные движения, длительные вращательные движения у поверхности воды или движение «на боку». Фиксация таких паттернов поведения в тестируемых пробах указывает на нейротоксическое действие загрязнителей.

3.3.2. Наполнение и перистальтика кишечника. У здоровой, активно питающейся дафнии кишечник имеет темно-зеленый цвет и хорошо наполнен (рис. 4). Пустой или слабо наполненный кишечник свидетельствует о снижении пищевой активности, вызванном интоксикацией, и может быть зафиксирован микроскопически до наступления необратимых изменений.

3.3.3. Изменение окраски покровов. Появление розоватого или красноватого оттенка у дафний, в отличие от нормальной желто-коричневой окраски, является признаком хронической гипоксии (рис. 5). В контексте воздействия ТМ это может быть следствием повреждения жаберного эпителия или нарушения транспорта кислорода.

3.4. Физиологический показатель — частота сердечных сокращений (ЧСС). ЧСС у *Daphnia magna* является высокочувствительным функциональным показателем, отражающим состояние метаболических процессов и реакции организма на стрессорное воздействие. Благодаря прозрачности карапакса и дорсальному расположению сердца, его сокращения отчетливо визуализируются при увеличении $\times 40$, что позволяет применять видеорегистрацию для количественной

оценки ЧСС. Сердце дафний, расположенное в спинной части тела между кишечником и выводковой камерой, функционирует миогенно, что делает его реакцию на внешние воздействия сопоставимой с реакцией сердечной мышцы позвоночных животных и повышает трансляционный потенциал получаемых данных [19, 20].

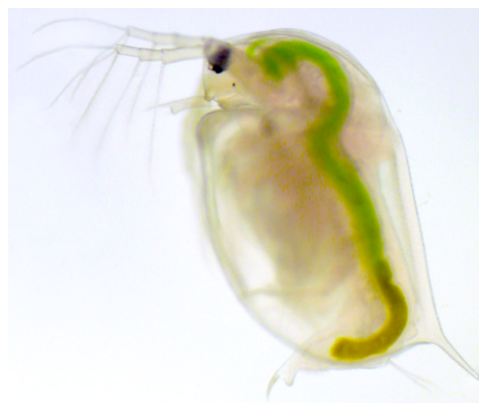


Рисунок 4 — Здоровый хорошо наполненный кишечник у *Daphnia magna*



Рисунок 5 — Вверху: внешний вид дафнии с желто-коричневой окраской (норма). внизу: внешний вид дафнии с красной окраской — признак кислородного голодания

В отличие от классических интегральных показателей (выживаемость, плодовитость), изменение ЧСС относится к числу ранних сублетальных ответов. Исследования на различных гидробионтах демонстрируют, что кардиотоксические эффекты могут регистрироваться при концентрациях токсикантов на несколько порядков более низких, чем вызывающие летальный исход [19]. В частности, для нейротоксичных соединений показано достоверное снижение ЧСС у *Daphnia magna* уже при концентрации 0,1 частей на миллиард (ppb), что подчеркивает диагностическую ценность данного показателя для оценки хронического загрязнения [20]. Помимо частоты сокращений, информативным параметром является вариабельность сердечного ритма, увеличение которой свидетельствует о нарушении нейрогуморальной регуляции и может служить ранним индикатором нейротоксического эффекта ещё до изменения средней ЧСС.

В рамках настоящей методики регистрацию ЧСС необходимо проводить на 7-е, 14-е и 21-е сутки эксперимента в дневное время. Для минимизации влияния двигательной активности на качество видеозаписи допускается кратковременная иммобилизация дафний с использованием 3 % раствора метилцеллюлозы, которая не оказывает значимого влияния на сердечный ритм в течение 30 минут наблюдения [20]. Видеозапись (не менее 30–60 секунд на особь) производится с помощью цифровой камеры, после чего в программе ImageJ с плагинном Time Series Analyzer проводится анализ частоты пульсаций путем регистрации динамического изменения пиксельной интенсивности в области сердца (рис. 6).

4. Программное обеспечение ImageJ. Java-ориентированное программное обеспечение для обработки и анализа изображений, разработанное сотрудниками Национального института здравоохранения (НИН, США). Программа предназначена для количественной обработки изображений, полученных методами световой и

электронной микроскопии, и широко применяется в биологических, медицинских и экологических исследованиях [21].

Ключевые характеристики ImageJ приведены в таблице 3.

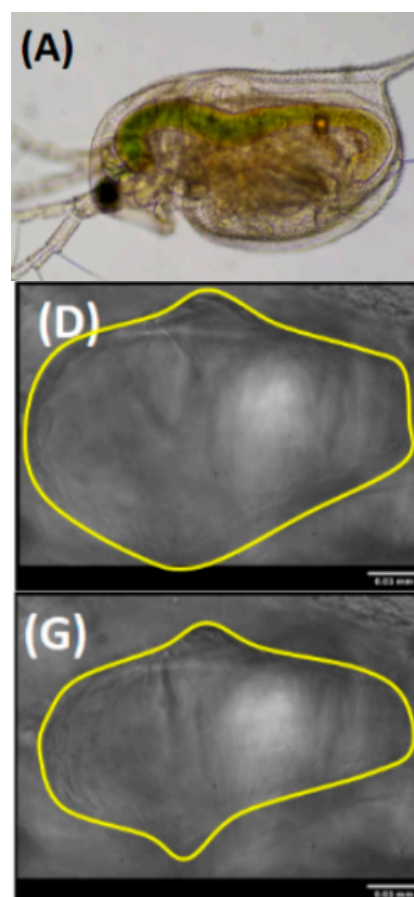


Рисунок 6 — Изображения сердца *Daphnia magna* (A), в стадии диастолы (D) и систолы (G)

Таблица 3
Ключевые характеристики ImageJ

Характеристика	Описание
Тип лицензии	Общественное достояние (Public Domain), свободное ПО
Платформа	Кроссплатформенное (Windows, macOS, Linux)
Архитектура	Открытая архитектура с поддержкой плагинов и макросов
Поддерживаемые форматы	TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM, а также видеоформаты

Функциональные возможности ImageJ: калибровка изображений по масштабу; измерение линейных размеров, площадей и объёмов объектов; анализ яркости и контрастности изображений; обработка временных рядов изображений и видеозаписей; отслеживание движения объектов и построение траекторий; использование плагинов для расширения функциональных возможностей.

Интерфейс программы представлен на рисунке 7.

4.2. Обоснование использования ImageJ в исследовании. Применение ImageJ в настоящем исследовании обосновано следующими факторами:

1) Соответствие задачам исследования. ImageJ позволяет количественно оценить выбранные морфофизиологические параметры *Daphnia magna* — морфометрические показатели (длина тела, длина хвостовой иглы), репродуктивные параметры (подсчёт abortивных яиц, эмбрионов) и ЧСС.

2) Валидированная методика. Использование ImageJ для оценки кардиоваскулярной функции у *Daphnia magna* подтверждено рецензируемыми научными публикациями [19, 20]. Кроме того, разработаны специализированные макросы для анализа сократительной активности, такие как MYOCYTER, которые значительно упрощают и автоматизируют процесс обработки видеоданных [22].

3) Работа с имеющимся оборудованием. ImageJ не требует специализированного аппаратного обеспечения и может использоваться с фотографиями (или Screenshot), видеозаписями, полученными при увеличении $\times 40$, что соответствует возможностям имеющегося микроскопа.

4) Открытый доступ. Программа распространяется бесплатно, что обеспечивает доступность метода и возможность его воспроизведения в других лабораториях.

5) Расширяемость. При необходимости в ходе исследования могут быть добавлены дополнительные плагины для автоматизации рутинных операций.

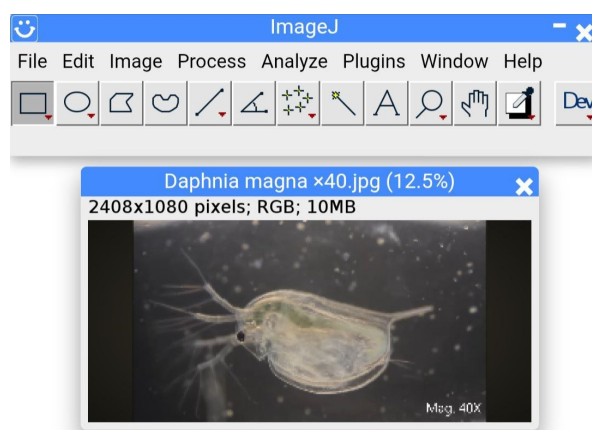


Рисунок 7 — Рабочий интерфейс программы ImageJ

4.3. Протокол работы с ImageJ. В рамках данной методики планируется следующий протокол работы с ImageJ:

1) Видеорегистрация: запись сердечной активности дафний с использованием цифровой камеры, установленной на микроскопе ($\times 40$).

2) Импорт и предобработка: загрузка видеофайлов в ImageJ, конвертация в последовательность кадров.

3) Морфометрический анализ: калибровка изображения с использованием объект-микрометра, измерение длины тела и хвостовой иглы с помощью инструментов линейных измерений.

4) Анализ ЧСС: применение плагина Time Series Analyzer для выделения области сердца и построения графика динамики пиксельной интенсивности, по которому рассчитывается частота сокращений (уд/мин).

5) Подсчёт репродуктивных показателей: визуальный подсчёт эмбрионов в выводковой камере и abortивных яиц с использованием инструментов подсчёта объектов.

5. Порядок проведения исследования.

Этап 1. Предварительный этап: отбор чувствительного генотипа

1) Сбор природной популяции (не менее 5–8 точек).

2) Выделение изолятов и их тестирование при низких концентрациях ТМ (на уровне NOEC).

3) Отбор клона с наибольшей чувствительностью по критериям, описанным в разделе 1.

Этап 2. Основной этап: хронический тест (21 день).

1) День 0. Помещение неонидов (возраст <24 ч) отобранного чувствительного клона в тестовые растворы (контроль и разведения исследуемой воды) в индивидуальные сосуды ($n \geq 10$ на концентрацию).

2) Ежедневно подсчёт и удаление потомства, а также регистрация гибели родителей и визуальная оценка состояния (окраска, поведение, наполнение кишечника).

3) При смене среды (3 раза/неделю):

– контроль pH, температуры, растворённого кислорода;

– отбор проб воды для химического анализа (при необходимости).

4) Дни 7, 14, 21 (видеорегистрация ЧСС):

– индивидуальное помещение дафнии на предметное стекло с каплей 3 % метилцеллюлозы;

– 1-минутная акклиматизация;

– видеозапись (30–60 секунд) области сердца при $\times 40$;

– возвращение дафнии в тестовый сосуд.

5) День 21 (завершение эксперимента):

– окончательный подсчёт потомства;

– измерение длины тела и хвостовой иглы;

– фотографирование и анализ всех показателей;

– фиксация материалов для последующей обработки.

Этап 3. Обработка полученных данных в ImageJ.

1) Анализ частоты сердечных сокращений: расчёт ЧСС по формуле: $\text{ЧСС (уд/мин)} = 60 / \text{средний интервал между пиками}$.

2) Морфометрический анализ:

– калибровка изображения с использованием объект-микрометра;

– измерение длины тела и хвостовой иглы инструментом Straight Line.

3) Подсчёт репродуктивных показателей: подсчёт эмбрионов и абортивных яиц.

Этап 4. Статистическая обработка данных. Обработка полученных данных производится с использованием специали-

зированного статистического программного обеспечения (GraphPad Prism, R, Statistica или аналогов).

Применимые статистические методы представлены в таблице 4.

Этап 5. Расчёт токсикологических показателей. Для каждого исследуемого показателя рассчитываются:

– NOEC — максимальная концентрация, не вызывающая статистически значимого отличия от контроля;

– LOEC — минимальная концентрация, вызывающая статистически значимый эффект;

– EC₅₀ — концентрация, вызывающая 50 % изменение показателя относительно контроля.

Для частоты сердечных сокращений дополнительно рассчитываются EC₁₀ и EC₂₀ как более ранние индикаторы токсического эффекта [20].

6. Критерии приемлемости теста (валидность). Валидность теста — это степень достоверности полученных результатов, обеспечивающая возможность их корректной интерпретации и сравнения с данными других исследований. Понятие валидности включает в себя не только статистическую значимость различий между контролем и опытом, но и биологическую состоятельность используемой тест-системы, а также воспроизводимость результатов в повторных экспериментах. В мировой практике токсикологических исследований соблюдение критериев валидности является обязательным условием для признания результатов лабораторных испытаний и их использования в целях экологического нормирования и регулирования [23].

Для признания хронического теста на *Daphnia magna* валидным необходимо одновременное выполнение ряда критериев, характеризующих состояние контрольной группы и стабильность условий эксперимента [16, 18, 20].

Сводные критерии, необходимые для признания хронического теста валидным, представлены в таблице 5.

7. Ожидаемые результаты и их интерпретация. В хроническом исследовании на *Daphnia magna* регистрируемые изменения показателей отражают различные уровни токсического воздействия ТМ (Cu, Zn, Cd, Pb и др.). Интерпретация по-

лученных результатов должна учитывать как направленность изменений (увеличение/уменьшение), так и их величину, а также взаимосвязи между различными тест-функциями [3]. Ожидаемые результаты представлены в таблицах 6А–6Г.

Таблица 4

Применимые статистические методы

Метод	Назначение
Дисперсионный анализ	Сравнение средних значений между контрольной и опытными группами
Тест Даннета (Dunnett's test)	Множественное сравнение с контролем для определения NOEC/LOEC
Пробит-анализ или нелинейная регрессия	Расчёт EC ₅₀ для исследованных показателей
Корреляционный анализ (Пирсона/Спирмена)	Выявление связей между концентрацией металлов и биологическими эффектами
t-критерий Стьюдента	Попарное сравнение показателей в динамике (дни 7, 14, 21)
Уровень статистической значимости принимается $p < 0,05$.	

Таблица 5

Условия признания теста валидным

Критерий	Норматив
Смертность родительских особей	Не более 20 % к концу теста
Среднее количество живого потомства на одну выжившую самку	Не менее 60 особей за 21 день
День первого приплода	7–12 сутки жизни особей
Появление абортивных яиц	Менее 20 % от суммарного количества молоди
Частота сердечных сокращений в контроле	540–580 уд/мин при 20–22 °С
Подтверждение генотипа	Использованная тест-популяция принадлежит к отобранному чувствительному генотипу
Диапазон температур	20 ± 1 °С на протяжении всего эксперимента
pH среды	6,5–8,5
Растворенный кислород	>3 мг/дм ³ в конце интервала между сменами среды

Таблица 6А

Прогнозируемые изменения выживаемости и репродуктивных показателей при хроническом токсическом воздействии

Показатель	Характер изменений при токсическом воздействии	Биологическая интерпретация
Выживаемость	Снижение (при высоких концентрациях)	Летальный эффект, необратимое нарушение жизненно важных функций
Общая плодовитость	Уменьшение количества потомства на самку	Репродуктивная токсичность, нарушение оогенеза или эмбриогенеза
День первого помета	Увеличение (задержка)	Замедление полового созревания, нарушение гормональной регуляции
Количество пометов за 21 день	Снижение частоты	Удлинение интервалов между линьками и репродуктивными циклами

Продолжение таблицы 6А

Показатель	Характер изменений при токсическом воздействии	Биологическая интерпретация
Размер молодежи в первом помете	Уменьшение	Нарушение питания эмбрионов, токсическое влияние на ранние стадии
Количество эмбрионов в выводковой камере	Уменьшение	Снижение репродуктивного потенциала на ранних этапах
Количество абортивных (неразвившихся) яиц	Увеличение	Прямое доказательство эмбриотоксического эффекта
Доля абортивных яиц	>20 % от общего числа	Критическое ухудшение состояния популяции

Таблица 6Б

Прогнозируемые изменения поведенческих и витальных параметров при хроническом токсическом воздействии

Показатель	Норма	Отклонение	Биологическая интерпретация
Окраска покровов	Желто-коричневая	Красная/розовая	Хроническая гипоксия, повреждение жаберного эпителия
		Бледная, стекловидная	Анемия, истощение
Наполнение кишечника	Темно-зеленый, хорошо наполнен	Пустой или слабо наполненный	Снижение пищевой активности, интоксикация
Характер движений	Равномерные, медленные	Резкие спонтанные движения	Нейротоксическое действие
		Вращательные у поверхности	Нарушение координации, поражение нервной системы
		Движение «на боку»	Тяжелая интоксикация
Распределение в толще воды	Равномерное	Скопление у поверхности	Дефицит кислорода
		Полегание на дно	Угнетение, тяжелая интоксикация

Таблица 6В

Прогнозируемые изменения морфометрических параметров при хроническом токсическом воздействии

Показатель	Характер изменений при токсическом воздействии	Биологическая интерпретация
Длина тела	Замедление линейного роста (уменьшение конечных размеров)	Ингибирование анаболических процессов, нарушение белкового и кальциевого обмена
Длина хвостовой иглы	Изменение (видозависимо)	Нарушение морфогенеза как маркер генотипической изменчивости
Высота головного шлема	Уменьшение	Общее угнетение ростовых процессов, нарушение формообразования

Таблица 6Г

Прогнозируемые изменения сердечной активности при хроническом токсическом воздействии

Показатель	Характер изменений при токсическом воздействии	Биологическая интерпретация
Частота сердечных сокращений (ЧСС)	Брадикардия (урежение)	Нарушение проводимости, кардиодепрессивный эффект
	Тахикардия (учащение)	Компенсаторная реакция на гипоксию, стресс
Вариабельность сердечного ритма	Увеличение (аритмия)	Нарушение нейрогуморальной регуляции
Регулярность ритма	Появление аритмий	Кардиотоксический эффект

Выводы:

1. Предложена детализированная методика 21-дневного хронического биотестирования на *Daphnia magna*, интегрирующая классические подходы (ОЕСД 211, ФР 1.39.2007.03222) с современными методами функциональной диагностики (видеорегистрация сердечной активности, морфометрический анализ, подсчет абортивных яиц).

2. Обоснована необходимость предварительного генотипического отбора чувствительных линий из природных популяций малых рек восточного Донбасса. Предложен алгоритм селекции (получение материала → экспозиция → изоляция → консолидация).

3. Определены оптимальные концентрации для селекции по основным тяжелым металлам (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni) с учетом их токсичности и влияния жесткости воды. Для кадмия рекомендована концентрация 0,0003–0,0008 мг/дм³, для меди — 0,008–0,015 мг/дм³, для цинка — 0,05–0,08 мг/дм³.

4. Установлено, что комплексное использование морфометрических (длина тела, длина хвостовой иглы), репродуктивных (плодовитость, абортивные яйца), поведенческих (характер движений, наполнение кишечника) и кардиоваскулярных (ЧСС, вариабельность ритма) показателей позволяет регистрировать сублетальные эффекты на разных уровнях организации — от физиологического до популяционного.

5. Показано, что частота сердечных сокращений является наиболее чувствительным маркером, позволяющим выявлять токсический эффект при концентрациях, на несколько порядков более низких, чем вызывающие летальный исход. Для кадмия порог регистрации эффекта по ЧСС составляет 0,1 ppb (0,0001 мг/дм³).

6. Предложен протокол обработки видеоматериалов в программе ImageJ, включающий калибровку изображений, морфометрические измерения и анализ ЧСС с

помощью плагина Time Series Analyzer. Данный протокол обеспечивает количественную оценку параметров и воспроизводимость результатов.

7. Сформулированы критерии валидности теста, объединяющие требования международных стандартов (ОЕСД, ИСО), российской нормативной документации и дополнительные показатели (состояние культуры, ЧСС), что повышает достоверность получаемых результатов.

8. Разработанная методика может быть рекомендована для использования в системе экологического мониторинга малых рек восточного Донбасса, а также для других регионов со сходными проблемами загрязнения ТМ.

В дальнейших исследованиях предполагается апробация разработанной методики на пробах воды из малых рек восточного Донбасса. В случае подтверждения ее эффективности в сравнении с результатами стандартных тестов дальнейшие исследования могут быть направлены на решение следующих задач.

1. Исследование синергетических и антагонистических эффектов при совместном действии нескольких тяжелых металлов, характерных для шахтных вод региона.

2. Разработка автоматизированных алгоритмов анализа ЧСС и морфометрических параметров в ImageJ с использованием макросов для повышения производительности и снижения субъективности измерений.

3. Изучение корреляции между кардиоваскулярными показателями и биоаккумуляцией тяжелых металлов в теле дафний для выявления механизмов токсического действия.

4. Оценка возможности использования разработанной методики для тестирования других типов загрязнителей (пестицидов, нефтепродуктов, фармацевтических препаратов).

5. Создание регионального банка селекционированных чувствительных генотипов *Daphnia magna* для стандартизации биотестирования в восточном Донбассе.

6. Разработка шкал градации токсичности на основе интегральной оценки всех исследуемых параметров (ЧСС, плодовитость, морфометрия) для перехода от констатации эффекта к количественной классификации степени загрязнения.

Список источников

1. Павлов В. И., Кулакова С. И., Климов Ю. С. Задачи обеспечения одинаковой и высокой физиологической чувствительности тест-организмов *Daphnia magna* Straus для биотестирования воды малых рек восточного Донбасса. // Экологический вестник Донбасса. 2025. № 2 (15). С. 3–7. EDN UKGQJ
2. Александрова В. В. Биотестирование как современный метод оценки токсичности природных и сточных вод. Нижневартовск : Нижневартовский государственный университет, 2013. 119 с. EDN ENAWHL
3. Олькова А. С. Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов : дис. ... д-ра биол. наук. Киров, 2020. 359 с. EDN IRBGXV
4. Генотипическая структура природной популяции дафнии по фенотипической реакции особей на изменение количества корма / Е. Л. Ермаков, С. И. Питулько, В. М. Корзун, Г. В. Гречаный // Генетика. 2010. Т. 46. № 2. С. 239–248. EDN LOIXWL
5. Ермаков Е. Л., Питулько С. И. Анализ генетических корреляций по фенотипической реакции особей по комплексу количественных признаков на изменение количества корма в природной популяции дафнии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3-3. С. 1110–1114. EDN RXEAFZ
6. Loria A., Cristescu M. E., Gonzalez A. Genotype diversity promotes the persistence of *Daphnia* populations exposed to severe copper stress // *Journal of Evolutionary Biology*. 2022. Vol. 35. № 2. P. 265–277. DOI: 10.1111/jeb.13979 EDN UWBVII
7. Plaistow S. J., Brunner F. S., O'Connor M. Quantifying population and clone-specific non-linear reaction norms to food gradients in *Daphnia magna* // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2022. Vol. 10. DOI: 10.3389/fevo.2022.982697 EDN UEZJLT
8. Воробьева О. В., Самойлова Т. А., Гершкович Д. М. Пути исследования морфофизиологических параметров лабораторных культур ветвистоусых ракообразных, применяемых для биотестирования // Актуальные проблемы изучения ракообразных : сборник тезисов и материалов докладов науч.-практ. конф., посвященной 90-летию со дня рождения Н. Н. Смирнова, Борок, 17–20 мая 2018 года. Борок : Филигрань, 2018. С. 57–59. EDN XWJVZR
9. Шилова Н. А., Рогачева С. М., Губина Т. И. Влияние биогенных металлов на жизнедеятельность *Daphnia magna* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т. 12. № 1-8. С. 1951–1953. EDN NDYGXF
10. Biesinger K. E., Christensen G. M. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna* // *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1972. Vol. 2. № 12. P. 1691–1700.
11. Ebert D. *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution // *EvoDevo*. 2022. Vol. 13. Art. 16. DOI: 10.1186/s13227-022-00199-0 EDN EGYEPI
12. Barata C., Baird D. J. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus // *Aquatic Toxicology*. 2000. Vol. 48. № 2-3. P. 195–209. EDN AEOXIZ
13. Моисеенко Т. И. Биодоступность и экотоксичность металлов в водных системах: критические уровни загрязнения // *Геохимия*. 2019. Т. 64. № 7. С. 675–688. DOI: 10.31857/S0016-7525647675-688 EDN GBYYBL
14. Lari E., D. Steinkey D., Pyle G. G. A novel apparatus for evaluating contaminant effects on feeding activity and heart rate in *Daphnia* spp. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017. Vol. 135. P. 381–386. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.018 EDN: XUOBND
15. Hill W. G., Mackay T. F. C. D. S. Falconer and Introduction to quantitative genetics // *Genetics*. 2004. Vol. 167. № 4. P. 1529–1536.

16. Олькова А. С. Контроль здоровья тест-культуры *Daphnia magna* Straus // Вода и экология: проблемы и решения. 2019. № 3 (79). С. 59–69. DOI: 10.23968/2305-3488.2019.24.3.59-69 EDN OCUGGD

17. Олькова А. С. Условия культивирования и многообразие тест-функций *Daphnia magna* Straus при биотестировании // Вода и экология: проблемы и решения. 2017. № 1. С. 63–82. DOI: 10.23968/2305-3488.2017.19.1.63-82 EDN ZRKPXT

18. ФР 1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М. : Акварос, 2007. 51 с.

19. Bownik A., Pawlocik M., Sokolowska N. Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia magna* // Polish Journal of Natural Sciences. 2017. Vol. 32. № 3. P. 481–493. EDN YFMEDJ

20. Cardiovascular performance measurement in water fleas by utilizing high-speed videography and ImageJ software and its application for pesticide toxicity assessment / F. Santoso [et al.] // Animals. 2020. Vol. 10. № 9. Art. 1587. DOI: 10.3390/ani10091587 EDN LRVNGQ

21. Абдрахимова Й. Р., Абдрахимов Ф. А. Биомимджинг клеток: введение в анализ изображений с помощью ImageJ : учебно-методическое пособие. Казань : Альянс, 2019. Ч. 1. 25 с.

22. The “MYOCYTER” — Convert cellular and cardiac contractions into numbers with ImageJ / T. Grune [et al.] // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. No. 1. Art. 15112. DOI: 10.1038/s41598-019-51676-x

23. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. М. : Стандартинформ, 2019. 26 с.

© Климов Ю. С., Павлов В. И., Кулакова С. И., 2026

**Рекомендована к печати к.б.н., доц. каф. ЭиБЖД ДонГТУ Швыдченко С. С.,
начальником службы экологической безопасности и производственной санитарии
управления охраны труда и промышленной безопасности ООО «ЮГМК» Краснонос Н. Н.**

Статья поступила в редакцию 15.03.2026.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Климов Юрий Сергеевич, магистрант II курса каф. экологии и безопасности жизнедеятельности
Донбасский государственный технический университет,
г. Алчевск, Россия, e-mail: klimov.bio@gmail.com

Павлов Валерий Иванович, канд. техн. наук, доцент каф. экологии и безопасности жизнедеятельности
Донбасский государственный технический университет,
г. Алчевск, Россия

Кулакова Светлана Ивановна, канд. техн. наук, доцент каф. высшей математики и естественных наук
Донбасский государственный технический университет,
г. Алчевск, Россия

*Klimov Yu. S., Pavlov V. I., Kulakova S. I. (Donbass State Technical University, Alchevsk, Russia, *e-mail: klimov.bio@gmail.com)

METHOD FOR CONDUCTING CHRONIC BIOTESTING OF NATURAL WATERS IN DONBASS

Method for conducting 21-day chronic biotesting using *Daphnia magna* Straus for the integrated assessment of toxicity of natural waters of Donbass contaminated with heavy metals is presented. Method takes into account the problems of genetic heterogeneity of populations, offering an approach

to the selection of sensitive genotypes. The test conditions, the procedure for creating a sensitive test-line, the studied parameters (body length, tail spine length, fecundity, abortive eggs, movement pattern, gut fullness, heart rate, rhythm variability), the protocol for data analysis in ImageJ, key toxicological indicators (NOEC, LOEC, $EC_{50/20/10}$), and statistical processing are described. The developed method allows to record the sublethal effects at concentrations of toxicants that are several orders of magnitude lower than the lethal concentrations, which enhances the diagnostic value of biotesting. The test validity criteria and expected results are given.

Key words: *Daphnia magna*, chronic research, biotesting, heavy metals, selection of sensitive genotypes, sublethal effects, heart rate, cardiotoxicity, morphometric analysis, abortive eggs, embryotoxicity.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Klimov Yury Sergeevich, Second-year Candidate for a Master's Degree of the Department of Ecology and Life Safety
Donbass State Technical University,
Alchevsk, Russia, e-mail: klimov.bio@gmail.com

Pavlov Valery Ivanovich, PhD in Engineering, Assistant Professor of the Department of Ecology and Life Safety
Donbass State Technical University,
Alchevsk, Russia

Kulakova Svetlana Ivanovna, PhD in Engineering, Assistant Professor of the Department of Higher Mathematics and Natural Sciences
Donbass State Technical University,
Alchevsk, Russia