



Мониторинг состояния почвы, воздуха, воды

УДК 504.064.3+504.4.054

DOI: 10.25514/CHS.2026.1.26112

Программно-аппаратный комплекс для биотестирования природных водных объектов

С. О. Травин¹, В. О. Швыдкий^{1,2}, Г. В. Швыдкий³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия, travins@yandex.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия, slavuta58@gmail.com

³Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Поступила в редакцию: 01.04.2026 г.; после доработки: 29.05.2026 г.; принята в печать: 01.06.2026 г.

Аннотация – Предложен программно-аппаратный комплекс для биотестирования с помощью подсчета числа подвижных биологических объектов (инфузорий *Tetrahymena pyriformis*) в поле зрения микроскопа. Видеофиксация изображения может проводиться с помощью простейших средств, в т.ч. с помощью камеры мобильного телефона. Программа для подсчета числа подвижных объектов в поле зрения микроскопа написана на языке Python и использует библиотечные функции OpenCV. Интерфейс пользователя допускает настройки по числу обрабатываемых кадров, порогу яркости и количеству пикселей размытия изображения. Программа может быть легко адаптирована к использованию совместно с самым простым оборудованием, в режиме покадровой или непрерывной съемки. Приводится сопоставление с другими известными средствами биотестирования.

Ключевые слова: биотестирование, подсчет живых инфузорий, программа обработки биотестов, *Tetrahymena pyriformis*, компьютерная обработка изображений.

Monitoring soil, air, water status

UDC 504.064.3+504.4.054

DOI: 10.25514/CHS.2026.1.26112

Hardware and software system for biotesting natural water bodies

Sergey O. Travin¹✉, Viacheslav O. Shvydkiy^{1,2}, George V. Shvydkiy³

¹N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: travins@yandex.ru

²Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Federal State Educational Institution of Higher Professional Education Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract – A hardware and software system for bioassays is proposed, which counts the number of mobile biological objects (ciliates) within a microscope's field of view. Video recording can be performed using simple tools, including a mobile phone camera. The program for counting the number of moving objects within a microscope's field of view is written in Python and utilizes OpenCV library functions. The user interface allows for adjustments to the number of frames processed, the brightness threshold, and the number of pixels for image blur. The program can be easily adapted for use with the simplest equipment, in frame-by-frame or continuous shooting modes. A comparison with other known bioassay tools is provided.

Keywords: biotesting, counting of live ciliates, program for photo-fixation of biotests, Cam2-V2.0, *Tetrahymena pyriformis*, computer image processing, Paracount_7.

ВВЕДЕНИЕ

Еще в 80-е годы XX века сотрудниками лаборатории гидроэкохимических процессов Института Химической физики АН СССР им. Н.Н. Семенова была высказана гипотеза редокс-токсикации водоемов [1]. Исследователи обратили внимание на то, что при «внешнем благополучии» основных гидрохимических показателей, входящих в систему нормирования качества воды, она оказывалась совершенно непригодной для выживания личинок осетровых рыб, которые, фактически, выступили в роли природного биотеста. Тем самым, как квинтэссенция интегральной оценки качества природных вод, был провозглашен приоритет методов биотестирования над стандартной системой гидрохимических показателей и более сложными аналитическими подходами.

Биотестирование – это процедура определения качества среды с помощью биологических тест-объектов, сигнализирующих об интегральной токсичности, независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Начиная с конца XX века биотестирование получило широкое признание во всем мире благодаря своей простоте, наглядности и универсальности.

С конца XX в. в России биотестирование стало обязательным элементом контроля качества поверхностных вод [2]. Показатели биотестирования были включены в перечень характеристик природных вод для выявления зон чрезвычайной экологической ситуации и зон экологического бедствия. В качестве простейших тест-объектов, неприхотливых для разведения в лабораторных условиях и дающих экспресс-результаты, чаще всего используют инфузории *Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium caudatum*, и др.

Как эукариотический микроорганизм, *Tetrahymena pyriformis* (*Tr*) быстро растет и в лабораторных оптимальных условиях делится каждые 2–3 часа (при температуре 25–28°C), что делает его превосходной экспериментальной системой для токсикологического анализа с использованием современных систем подсчета клеток [3, 4, 5]. Подсчитывая количество организмов при различных экспериментальных условиях легко отслеживать ингибирование или стимуляцию роста и анализировать токсикологический эффект [6].

Также выяснилось, что результаты биотестирования на простейших хорошо коррелируют с результатами, полученными в опытах *in vivo* на высших организмах, в т.ч. теплокровных животных [7]. Но вместо более широкого исследования и внедрения методов биотестирования в практику токсикологических лабораторий для определения качества пищевых продуктов, кормов для животных и вод хозяйственного и бытового назначения, поток соответствующей публикационной активности почти прекратился, особенно в западных странах и Китае.

Вероятно, основной, если не единственной причиной такого спада является отсутствие доступных (по цене и простоте обслуживания) автоматических счетчиков биологических микрообъектов. А количественная оценка числа объектов является едва ли не единственным точным и фундаментальным инструментом анализа в биологии, медицине и других науках о жизни [5].

Идея автоматического подсчета различных объектов существует почти так же долго, как и персональные компьютеры. К настоящему времени разработано несколько программ для автоматического подсчета клеток, но большинство из них требуют дополнительного обучения или ввода данных от пользователя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения фото-видеосъемок инфузорий *Tr* были изготовлены устройство для крепления видеокамеры и специальный микроаквариум (МА). В качестве основы и прозрачного дна МА было использовано оптически чистое предметное стекло, на которое была наклеена с помощью двухсторонней клейкой пленки пластиковая черная матрица с тремя продольными круглыми отверстиями диаметром 16 мм с толщиной 1,0 мм. После внесения капли жидкости с инфузориями объемом 0,2 мл в каждый МА, внутри МА формировался «водоем», ограниченный стенками круга, с глубиной не более 1.0 мм.

Снизу МА подсвечивали «микролюстрой», состоящей из 12 белых светодиодов, размещенные по периметру на узком цилиндре диаметром 150 мм из ПВХ. Подобное расположение светодиодов обеспечивает бестеневое и равномерное освещение МА, что является принципиальным для получения качественного изображения. Питание светодиодов обеспечивали стабилизированным блоком питания на 12 вольт. При этом мерцания освещенности не наблюдали.

Для фото и видео съемки использовали Web камеру SMT-U2812 (разрешение 2 МП), интегрированную в устройство фотофиксации, получившее название TetraТест-1 (рис.1). В принципе, съемка поля МА может производиться также камерой любого смартфона, причем разрешение в 2 мегапикселя уже представляется достаточным, а 5 МП даже избыточным.

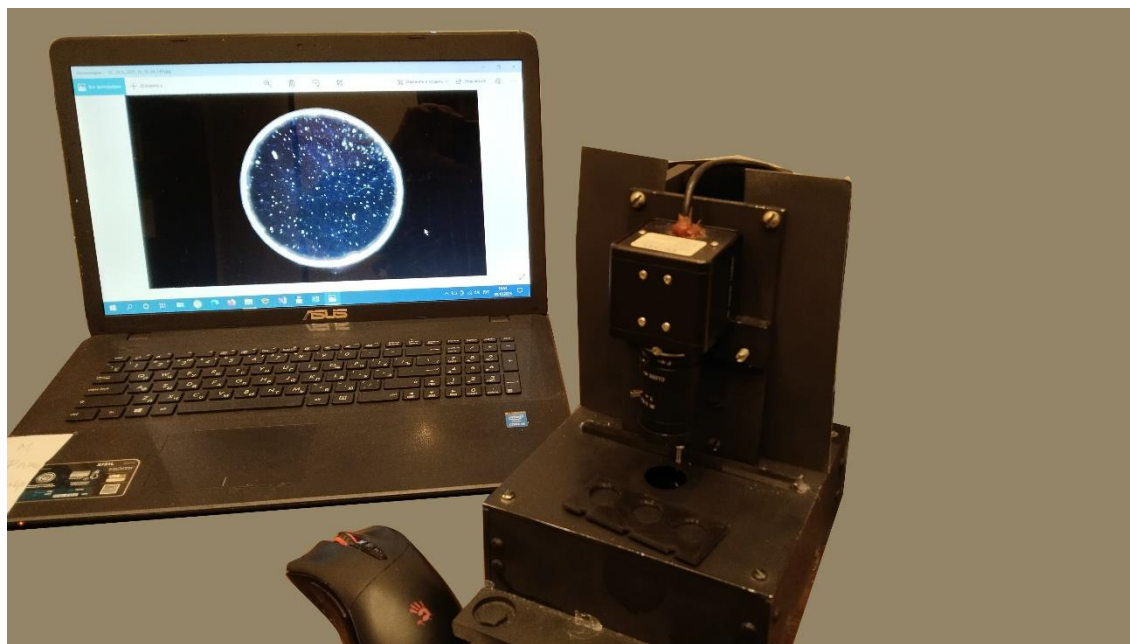


Рис. 1. Экспериментальный программно-аппаратный комплекс фотофиксации и подсчета живых клеток *Tetrahymena Pyriformis*, TetraTest-1.

Fig. 1. Experimental hardware and software complex for photofixation and counting of living cells of *Tetrahymena Pyriformis*, TetraTest-1.

Фотофиксацию содержимого МА с инфузориями *Tr* осуществляли с помощью программы Cam2, стандартной серией из 11 кадров с интервалом 100 мсек. Программа позволяет настраивать интервал съёмки, формировать имя файла с расширением JPEG, и место на диске для хранения полученных изображений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активно использовать инфузории *Tetrahymena Pyriformis* в качестве биотеста для определения качества природных, сточных вод и кормов начали еще в 80-х годах прошлого столетия. Подсчет клеток велся под микроскопом, предварительно убитой и окрашенной йодом культуры *Tr*. Метод ограничивался небольшим количеством клеток удобным при ручном подсчете, был трудоемок и отличался относительно большой погрешностью и человеческим фактором.

Были также попытки заменить ручной подсчет автоматическим. В частности, в России в начале 2000-х был создан автоматизированный комплекс «Биолат-3» (производитель ООО «Европолитест», г. Москва, РФ) для подсчета живых особей инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и *Paramecium* с использованием программы AutoSelita, разработанной на платформе Delfi [8]. Комплекс хорошо себя зарекомендовал в медицинских целях, а также при оценке качества кормов, почв и природных вод. При всех достоинствах данного комплекса стоит отметить его слабые стороны: маленькое разрешение и глубина резкости, использование черно-белых аналоговых камер, относительно большая глубина лунки (около 2 мм), что не позволяет фиксировать инфузорий вне диапазона глубины резкости, а также высокий порог необходимой

исходной концентрации инфузорий (300 шт. и более). Для получения стабильного результата, в опыте исходная концентрация T_p должна быть не менее 500 шт в 200 мкл пробы. А это, в свою очередь, при большой исходной концентрации инфузорий снижает чувствительность метода и приводит к чрезмерному приросту инфузорий за 24 часа культивирования в соответствии с [9, 10].

Известны различные альтернативные программы подсчета клеток, но большинство из них не позволяют пользователям отслеживать результаты подсчета микрообъектов в режиме реального времени, т.е. онлайн. Авторы из Университета Любляны (Словения) [4] разработали две простые в использовании программы подсчета клеток и опубликовали их описание, которые также позволяют пользователям корректировать результаты обнаружения. К сожалению, как это часто бывает, приводимые в работе [4] ссылки не дают доступа к коду программ и об их достоинствах и недостатках можно судить только исходя из упомянутой публикации. При этом значительное количество нюансов, совершенно необходимых для практического использования, остались вне обсуждения.

Также наибольшую известность получили несколько методов количественной оценки числа и активности различных биологических объектов, причем чаще всего используют флуоресцентные красители в сочетании с различными протоколами, где количество флуоресцентных клеток и/или интенсивность флуоресценции являются показателями конкретного эффекта.

В свою очередь, флуоресцентно окрашенные клетки можно обнаружить и проанализировать с помощью проточной цитометрии [11, 12], спектрофлуориметрии [13] или сканирующей лазерной микроскопии [14]. Существуют также другие методы подсчета, которые не основаны на флуоресцентной маркировке, такие как подсчет с помощью счетных камер (гемоцитометрия) и иные подходы, которые объединяет принцип подсчета импульсов при протекании клеточной суспензии мимо детектора (т.н. счетчики Коултера [15, 16]). Эти дорогие и специализированные устройства, однако, могут оказаться недоступны для лабораторий с ограниченными ресурсами или в образовательных учреждениях.

Цифровой анализ изображений может облегчить ручной подсчет для повышения эффективности и согласованности. Программное обеспечение, такое как ImageJ¹ (сам пакет ImageJ можно загрузить с официального сайта загрузки) [17, 18], предоставляет множество инструментов для облегчения процесса подсчета, начиная от счетчика объектов, редактирования изображений и вычисления объектов.

Пользователи ImageJ могут настроить пороговое значение уровня заметности для интересующего объекта подсчета. А инструмент «Анализ частиц» может быть применен для выделения и подсчета объектов в соответствии со значениями порогов размера и округлости.

¹ <https://imagej.net/ij/download.html>

Рабочий модуль ImageJ.exe является исключительно компактным и занимает всего 165К. А весь пакет в распакованном виде занимает меньше 8Мб.

Минусом является то, что для работы всего пакета требуется дополнительная установка виртуальной Java-машины, на что далеко не все пользователи ПК способны и согласны, даже при доступе к коду, а это 132000 строк на языке JAVA. Такой объём кода сам по себе может отпугнуть потенциальных пользователей.

В процессе исследований и оптимизации метода нами было проведено большое количество серий фотографирования инфузорий *Tr* в МА в проходяще-отраженном свете с использованием белых светодиодов. Результаты оказались обнадеживающие. На реальном фото (рис. 2) видно, что поле равномерно освещено и заполнено инфузориями *TP* (это белые точки).

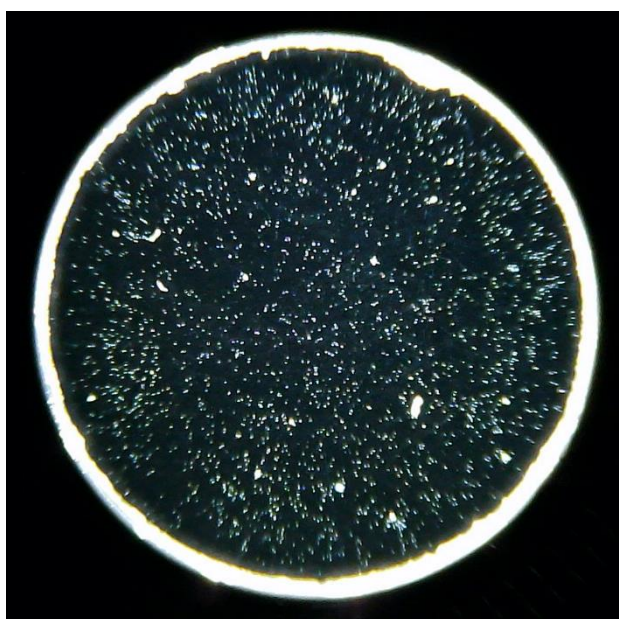


Рис. 2. Пример одного кадра из серии в 11 кадров, полученного Web-камерой SMT-U2812 (2 Мп).

Fig. 2. An example of one frame from a series of 11 frames obtained with the SMT-U2812 webcam (2 MP).

Удачные фото были использованы для создания и отладки программы компьютерной обработки Paracount_7. При разработке использовали библиотеки OpenCV (Open Computer Vision, открытое машинное зрение) на языке Python, что позволило добиться высокой функциональности программы, используя примерно десяток ключевых команд, по одной строке каждая (с вызовом библиотечных процедур).

На рисунке 3 представлены типичные кадры фотосъемки клеточной культуры инфузорий *Tr* в питательном растворе, полученные камерой Levenhuk 130, установленной на микроскопе для предварительной отладки программы.

В ненастроенном виде программа подсчитывает не только инфузории, но и продукты их жизнедеятельности, которые на изображении будут занимать всего один или два пикселя, но будут считаться как отдельный объект. Кроме

того, подсчет искажают присутствующие на снимке агломераты, площадь которых может превышать площадь одиночной инфузории в пределах двух порядков. Для получения правильного результата необходимо кроме разбиения изображения на контуры-примитивы проводить также их дискриминацию по площади.

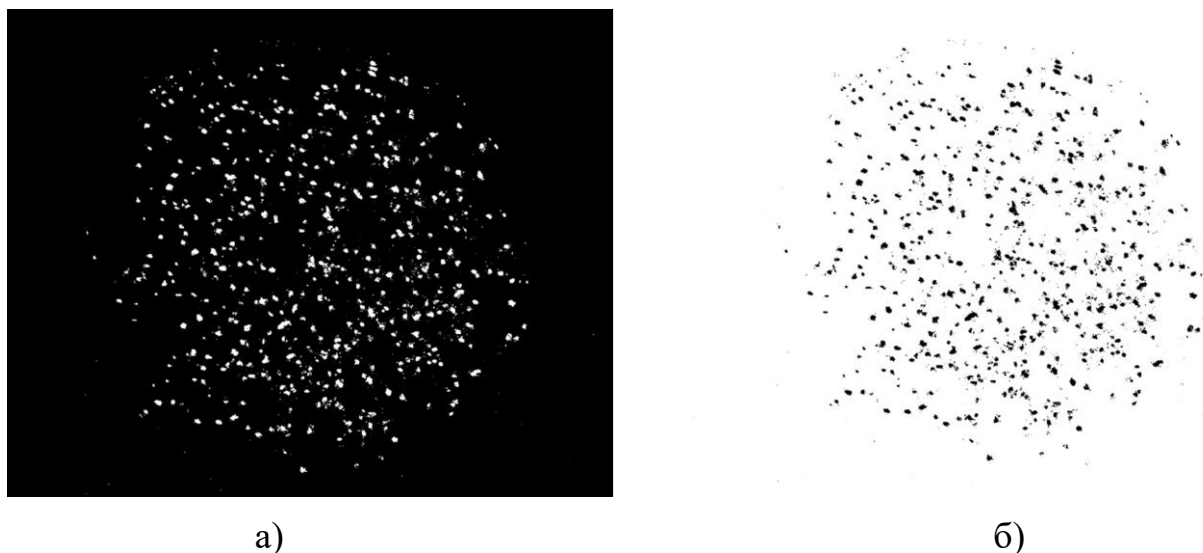


Рис. 3. Обработка изображения вычитанием и удалением фона. Слева а) шестой (последний) кадр серии. Справа б) Тот же кадр после преобразования с использованием автоматической функции *dilation*.

Fig. 3. Image processing with background removal and subtraction. Left: a) the sixth (last) frame of the series. Right: b) the same frame after conversion using the automatic dilation function.

На рисунке 3-а показан результат, полученный вычитанием из шестого кадра шестикратно усредненного фона и на 3-б преобразование с помощью библиотечной функции *dilation* (переводится с английского как расширение или растяжение).

Представленные на рисунке 3 изображения уже практически готовы к машинному подсчету числа находящихся объектов. Во всех без исключения версиях программы такой подсчет с использованием библиотечной функции выделения контуров программа выдает следующие результаты:

Objects found 2336

I think, correct answer is 557.

Первый ответ относится к изображению 3-а. и включает в себя все контура, включая однопиксельные. Второй подсчёт, который программа рекомендует как правильный, относится к изображению 3-б, он даёт результат подсчёта в четыре раза меньший, хотя методика подсчета контуров применяется однотипная. Основное различие состоит в том, что в первом случае программа собирает весь «мусор» с изображения, тогда как после размывания на рис. 3-б от этого мусора не остаётся и следа. Подчеркнём, что программа автоматического подсчета включает и контура с нулевой площадью.

Как это ни парадоксально, но эти визуально не обнаруживаемые контуры вносят очень существенный вклад в суммарный подсчет. Очевидно, что первый результат является откровенно завышенным, тогда как второй заведомо ближе к истине, хотя называть его правильным без надлежащей калибровки явно преждевременно.

Заметим, что программа ImageJ «распознала» на аналогичном кадре всего 7 объектов, тогда как Paracount_7 выдает для этого кадра примерно на два порядка больше инфузорий, что гораздо ближе к интуитивно правильному значению (строгий визуальный подсчет не производился).

В ходе наших исследований сопоставляя функциональность программы ImageJ и Paracount_7 мы убедились в том, что с помощью инструментария ImageJ удовлетворительного результата можно добиться лишь при соблюдении не менее, чем двух условий:

- 1) Высокая степень разрешения на снимке, не ниже 3840 x 2160 пикселей, что оказалось за пределом возможностей нашего оборудования;
- 2) Высокая степень увеличения, такая, чтоб размер изображения единичной инфузории превышал 1000 пикселей (что нереально!).

Тем самым использование инструментария ImageJ уместно лишь применительно к очень качественным крупномасштабным снимкам, которые даже визуально воспринимаются как набор практически неперекрывающихся крупных объектов расстояние, между которыми существенно превышает их размеры.

И хотя в публикациях [6, 17, 19, 20] декларируется не менее, чем 90% совпадение результатов ручного подсчета и с помощью программы ImageJ, нам подобного уровня распознавания на имеющихся в нашем распоряжении экспериментальных микрофотоснимках достичь не удалось. Более того, даже на модельных изображениях с заранее известным количеством контрастных эллипсов, чаще всего подсчет с помощью программы отклонялся от реперного значения в 4-10 раз, причем в непредсказуемую сторону (преувеличения или преуменьшения).

Один из важных моментов, касающихся машинной обработки изображений, относится к выбору порога яркости. В ранних работах (и мы в самом начале проведенного исследования) уделяли этому вопросу значительное внимание. Считалось, что изображения объектов или хотя бы их контуры имеют значительное отличие от фона по яркости. Надо отметить, что это далеко не всегда так. С контрастными изображениями, разумеется, работать легко и приятно, но фактически снятые кадры микроаквариума далеко не всегда отвечают требованиям экспериментатора.

На рисунке 4 представлены зависимости числа контрастных объектов в зависимости от устанавливаемого вручную порога различимости объекта и фона (напомним, что для каждого из цветовых каналов RGB, равно как и для снимков в градациях серого минимальная яркость соответствует 0, а максимальная – 255).

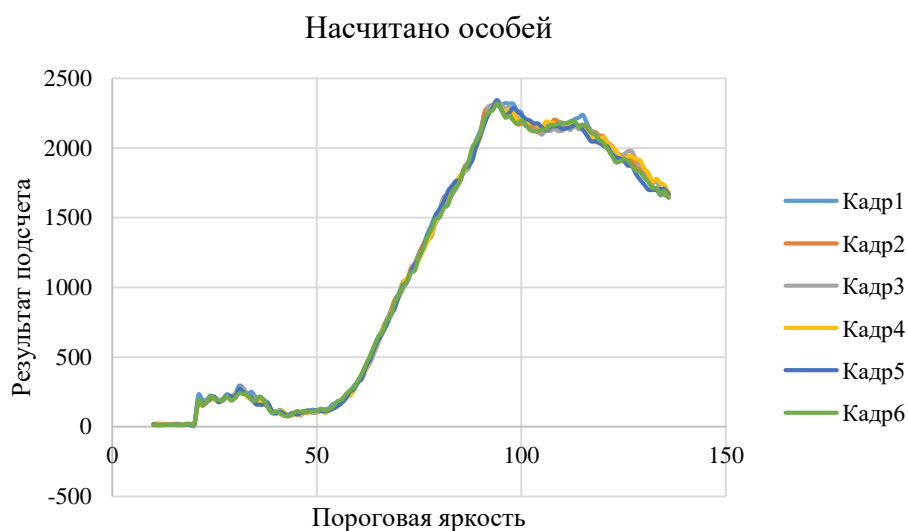


Рис. 4. Зависимость результатов подсчета клеток от значения пороговой яркости.

Fig. 4. Dependence of cell counting results on the threshold brightness value.

В данном случае никакой дискриминации по размеру объекта не производится и в подсчете учитываются все объекты с размером больше одного пикселя.

Видно, что при ручном подборе яркости в «разумном» диапазоне от 50 до 100 результат подсчета изменяется более, чем на порядок, что может привести к недопустимо субъективному результату, о чем неоднократно упоминалось практически во всех публикациях по цитометрии. По этой причине, оставив в интерфейсе программы возможность ручного регулирования пороговой яркости с выводом полученных изображений на просмотр, мы отказались от ручного задания порога в алгоритмах подсчета и перешли на автоматическое его определение, с чем превосходно и безошибочно справляется библиотечная функция из OpenCV: **adaptiveThreshold**

Важно подчеркнуть, что перед пороговой и иной автоматической обработкой изображений с помощью библиотечных функций их необходимо (в подавляющем большинстве случаев) конвертировать в градации серого.

В цветовой модели YUV компонента Y отвечает за яркость пикселя, это взвешенная сумма компонентов RGB. Компоненты U и V соответствуют разностям яркостей синего и красного каналов с усредненной яркостью Y. За счет особенностей строения (колбочки и палочки) человеческий глаз гораздо лучше отличает яркость, нежели оттенок цвета. Кроме того, в этом формате изображение более компактно – оно требует всего лишь три байта на четыре пикселя.

В то же время, с позиций машинного зрения такое преобразование не влияет на результаты работы программы распознавания отдельных объектов и сопоставимо с прочтением изображения в оттенках серого. Поэтому полезность такого преобразования, хотя его рекомендуют в некоторых руководствах по OpenCV, представляется весьма ограниченной и мы ее не подтверждаем.

Вообще, все преобразования, направленные на увеличение контрастности, подбор яркости, пороговую обработку изображения и переход к

черно-белому полотну имеют весьма ограниченную применимость и эффективность. Фактически, наиболее действенной оказалась библиотечная функция вычитания фона.

Эмпирически мы установили, что удаление фона начинает хорошо работать при числе кадров больше 5 (естественно – чем больше, тем лучше). На рисунке 5 показана зависимость числа автоматически подсчитанных инфузорий по мере увеличения номера кадра (на самом деле роль играет не сама нумерация, а количество усреднений фона, вычитаемого из изображения).

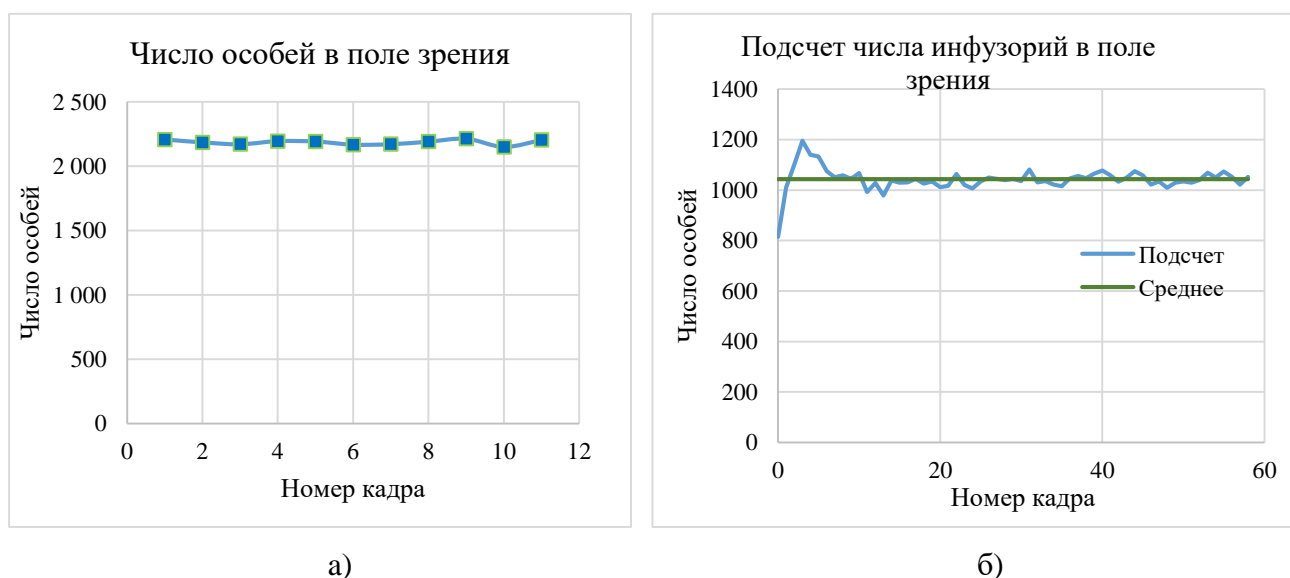


Рис. 5. Зависимость результатов подсчета клеток от номера кадра; применяется процедура автоматического (программного) вычитания фона. Слева а) для серии снимков, аналогичной рис.4. Справа б) обработка видеоролика на 60 кадров.

Fig. 5. Dependence of cell counting results on frame number; automatic (software) background subtraction procedure is applied. Left a) for a series of images similar to Fig. 4. Right b) video processing for 60 frames.

Надо отметить, что кажущаяся «гладкость» получаемых после пяти кадров подсчетов не имеет никакого отношения к их истинности. На самом деле программа всюду дает сильно завышенный (примерно двукратно) результат подсчета, но всюду одинаково завышенный. Поэтому случайный разброс в 2,5%, который виден на рис. 5 оказывается совершенно незначим по сравнению с систематической ошибкой, вызванной отсутствием калибровки.

О распределении фотографируемых объектов по размерам.

Прийти к «условно правильному» подсчету живых микроорганизмов удастся, введя дискриминацию объектов по размеру. Если принимать к подсчету только относительно крупные blobs (от английского blob - Binary Large Object – двоичный большой объект), содержащие больше, чем $7 \times 7 = 49$ пикселей, то результат в пределах нескольких процентов окажется близким к получаемому трехкратной итерацией по размытию. Напомним, что в

основополагающих работах [4], [6] подсчету и анализу подвергались только blobs размером свыше 1000 пикселей.

На самом деле ситуация с распределением идентифицируемых контуров по размеру несколько сложнее. На рисунке 6 представлена «каноническая» фотография *Tetrahymena Pyriformis*. Как следует из названия (*Pyriformis* на латыни это «грушевидная») инфузория имеет грушевидную форму, которая неплохо описывается эллипсом.



Рис. 6. На фотографии из Википедии представлена известная форма инфузории *Tr*. Зеленый контур представляет собой правильный эллипс с соотношением полуосей 1,8 : 1.

Fig. 6. The photograph from Wikipedia shows a familiar form of ciliate *Tr*. The green outline is a regular ellipse with a semi-axes ratio of 1.8:1.

Исходя из соотношения освещенностей тела инфузории в центре и на периферии, можно прийти к выводу, что инфузория представляет собой скорее «плоскую лепёшку», чем эллипсоид вращения. На рисунке 7 представлен трехосный эллипсоид с соотношениями осей 5 : 2 : 1 и его аксонометрические проекции. Дальнейший численный анализ показал, что такое соотношение размеров в значительной степени адекватно наблюдаемому в эксперименте распределению площадей.

Сама по себе задача исследования распределения площади «тени эллипсоида» или наблюдаемого значения площади его проекции на выбранную плоскость наблюдения при случайной ориентации осей в пространстве, хотя и относится к элементарной математике, решение ее содержит нетривиальные выкладки.

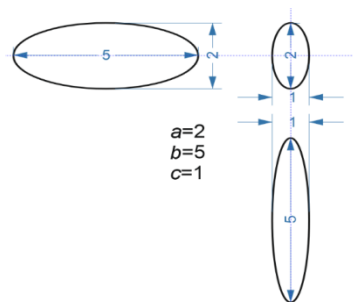
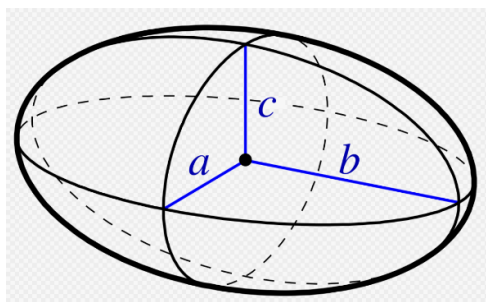


Рис. 7. Слева представлен трехосный эллипсоид, справа – его аксонометрические проекции. Соотношение осей 5 : 2 : 1 близко к наблюдаемому в эксперименте.

Fig. 7. A triaxial ellipsoid is shown on the left, and its axonometric projections are on the right. The axial ratio of 5:2:1 is close to that observed experimentally.

Учитывая то, что площадь эллипса (или отбрасываемой эллипсоидом тени) дается произведением его полуосей.

$$S = \pi \cdot ab$$

Несложно убедиться, что максимальная отбрасываемая тень для эллипсоида с размерами рис. 11 составит $10 \cdot \pi/4$, тогда как минимальное значение будет всего лишь $2 \cdot \pi/4$, т.е. разница пятикратная.

Важной особенностью распределения по наблюдаемым размерам оказывается то, что в отличие от привычных распределений, например, Гауссового, в случае свободно вращающегося эллипсоида максимум частоты появления будет иметь место не вблизи среднего значения, а напротив, на краях, рисунок 8.

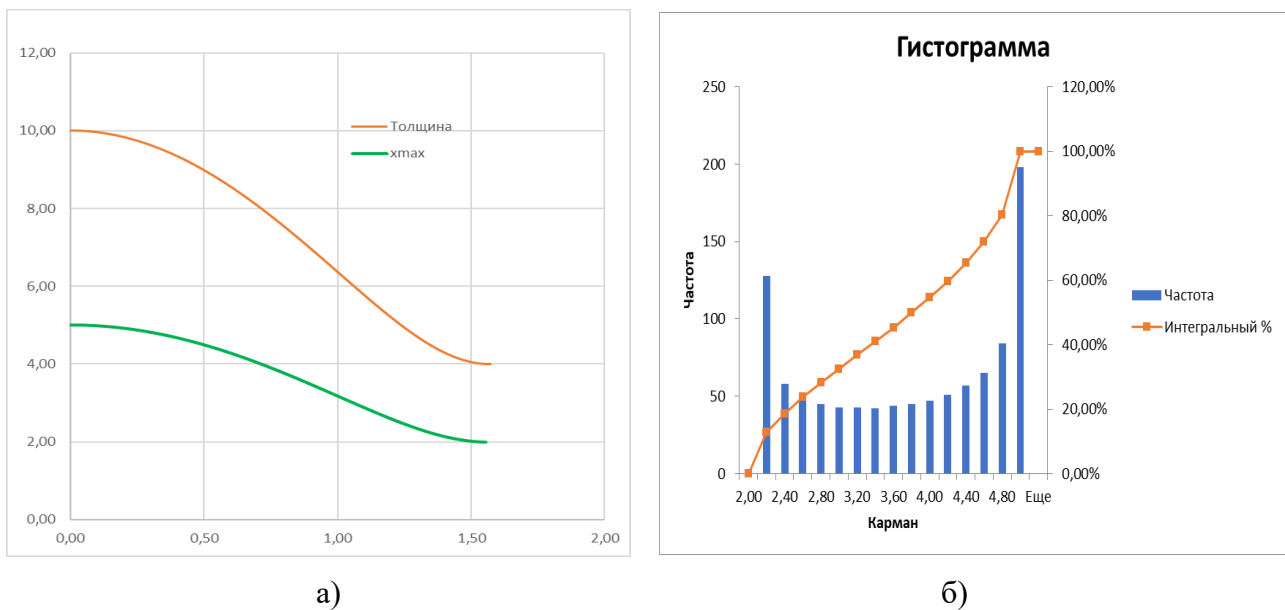


Рис. 8. На графиках а) представлена зависимость ширины (оранжевый) и полуширины (зеленый) проекции эллипса с полуосями $a = 5$; $b = 2$ в зависимости от угла наклона главной оси в диапазоне $[0; \frac{\pi}{2}]$; б) приведена гистограмма частот появления ширины проекции.

Fig. 8. Plots a) on the left show the dependence of the width (orange) and half-width (green) of the projection of the ellipse with semi-axes $a = 5$; $b = 2$ depending on the angle of inclination of the main axis in the range $[0; \pi/2]$. Right б) shows a histogram of the frequencies of appearance of the projection width.

Выбранный для рисунка 8 диапазон соответствует движению «купола» эллипса в первом квадранте координатной системы. Очевидно, что движение в остальных трех квадрантах дает точно такие же зависимости с точностью до операций симметрии. Гистограмма справа показывает частотное распределение проекций. Видно, что максимумы вероятности приходятся на максимальное и минимальное значение проекций, тогда как среднее значение наименее вероятно.

Если рассмотреть, как именно распределены по размерам (по величине площади) объекты, определяемые с помощью алгоритмов Open CV, можно

убедиться, что наблюдается логнормальное распределение. Этот факт является скорее ожидаемым, чем неожиданным. Ещё в сороковых годах прошлого века А.Н. Колмогоров [21] обосновал универсальность именно этого распределения.

В своей работе Колмогоров ссылался на работу известного геолога Н. К. Разумовского [22, 23], где указано много случаев, в которых логарифмы размеров частиц (золотин в золотоносных россыпях, частиц горных пород при их дроблении и т. п.) подчиняются приблизительно гауссовскому закону распределения. Задачей работы А.Н. Колмогорова [21] было указать довольно общую схему случайного процесса последовательного дробления частиц, для которой в пределе (при неограниченном продолжении дробления) гауссовский закон распределения для логарифмов размеров частиц может быть установлен теоретически. Возможно, что аналогичные соображения помогут объяснить и применимость гауссовского распределения к логарифмам содержания минералов в отдельных пробах (этому вопросу посвящена в основном цитированная Колмогоровым заметка Н.К. Разумовского).

Применительно к задачам подсчета инфузорий важно отметить, что анализ логнормального распределения дает «истинную» величину средней площади наблюдаемых объектов. Фактически из-за наличия загрязнений, пузырьков воздуха, слипшихся останков инфузорий, в автоматический подсчет включаются как объекты в десяток раз меньшие «правильного» размера, так и ассоциаты, превышающие мыслимую величину инфузории на два порядка.

Если в обычной статистике принято учитывать выбросы, не превышающие 3σ (три ширины гауссового распределения), то применительно к размерам инфузорий целесообразно ограничиться величиной 1σ . Так определяемое по данным рисунка 8 среднее значение площади составляет около 10 (квадратных пикселей), что примерно соответствует полуосям эллипсоида 2 и 5 пикселей, то величина σ (для логарифмического масштаба) составляет около 0,37 единиц (логарифмических). Тем самым значимые величины площади должны приниматься в расчёт в диапазоне значений от примерно 5 (минимальная проекция) до 25 (максимальная проекция). Эти ограничения хорошо согласуются со значениями, получаемыми из геометрического анализа на рисунках 9а и 9б.

Обычно в математической статистике полагают, что отклонение за пределы 3σ свидетельствует о невозможности (или недостоверности) полученного измерения. Применительно к размерам тетрахимен мы эмпирически убедились в том, что основная масса живых особей имеет разброс по площади в пределах $0,9 - 1,0 \sigma$. В то же время, искусственная дискриминация по размеру сильно влияет на результат подсчета.

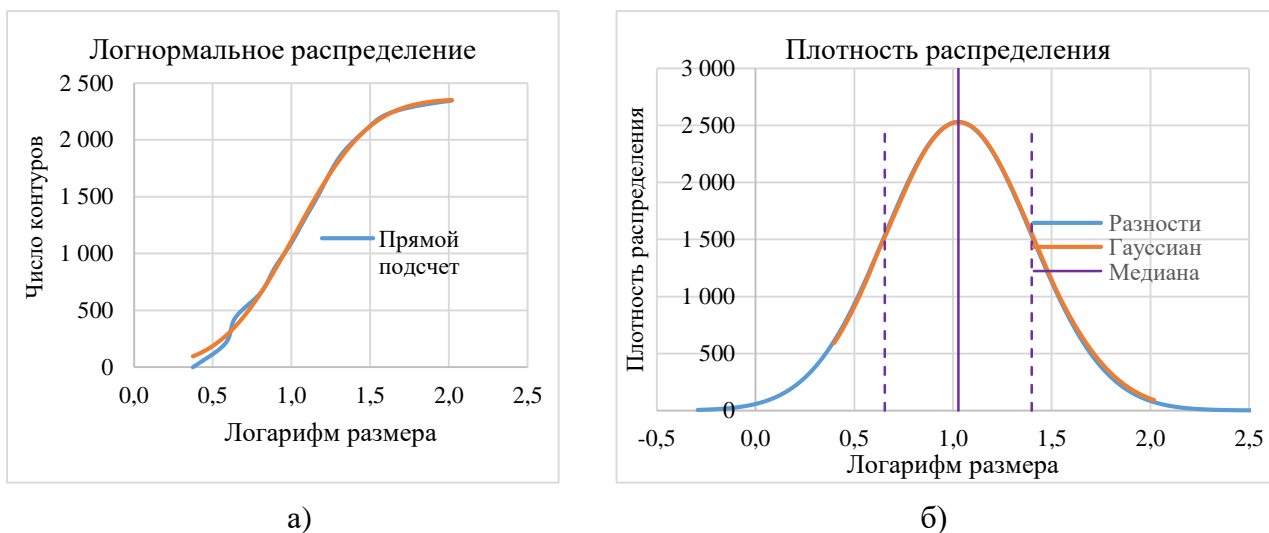


Рис. 9. Логнормальное распределение экспериментально полученной площади объектов, детектируемых программой. Слева (а) интегральное распределение, справа (б) плотность вероятности.

Fig. 9. Log-normal distribution of experimentally obtained area of objects detected by the program. Left (a) integral distribution, right (b) probability density.

На рисунке 10 показано, что между автоматически подсчитанными количествами движущихся объектов (инфузорий) независимо от алгоритма дискриминации наблюдается очень точная пропорциональная зависимость. Отсюда следует, что для практической оценки качества водной среды конкретные значения максимального и минимального порогов величины площади наблюдаемого объекта принципиального влияния не имеют.

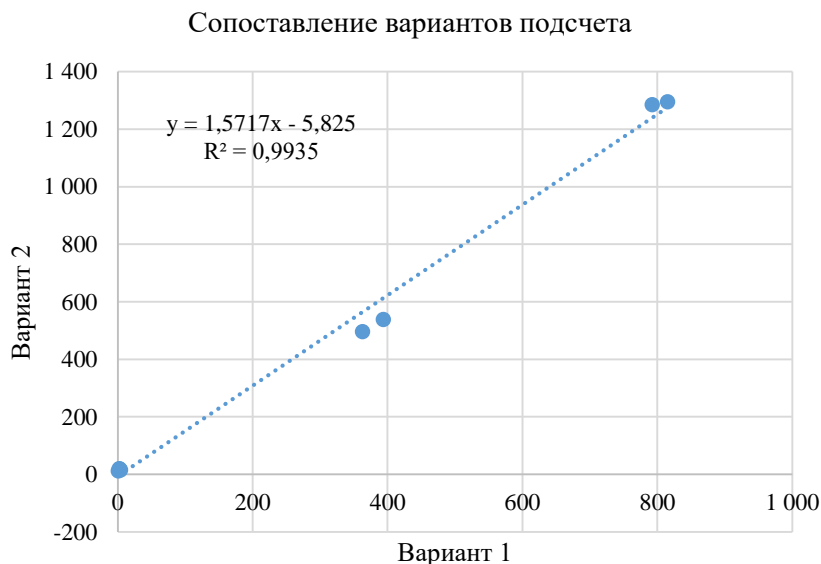


Рис. 10. Сопоставление результатов подсчета числа инфузорий, полученных двумя независимыми программными алгоритмами.

Fig. 10. Comparison of the results of counting the number of ciliates obtained by two independent software algorithms.

Таким образом, на примере реального изображения живой популяции инфузорий *Tetrahymena pyriformis* показаны этапы компьютерных автоматических преобразований для последующего машинного подсчета клеток. Применение системы фотофиксации клеток в микроаквариумах и программы Paracount_7 для подсчета живых клеток позволяет существенно упростить процесс биотестирования и повысить его точность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время доступно довольно много программ для анализа микроскопических изображений и подсчета клеток, в том числе и слипшихся, поставляемых как на коммерческой основе, так и бесплатных. Среди продаваемых программ наиболее известны такие как METAMORPH (Молекулярные устройства, Даунингтаун, Пенсильвания, США), BioQuant (Image Analysis Corporation, Нэшвилл, TN, США), Image-Pro (медиа-кибернетика, Bethesda, MD, США) и система Cellscreeener (Innovatis AG, Билефельд, Германия). В России нашёл применение комплекс «Биолат 3», позволяющий анализировать за одну серию 20 лунок с контролем и пробами.

В сегменте свободно доступного (бесплатного) программного обеспечения наибольшую известность получил пакет ImageJ (Национальный институт здравоохранения США) к которому также разработаны многочисленные плагины [20](Gallagher, 2008) или настраиваемые макросы [24, 25] (Ganias et al., 2010; Cai et al., 2011). Многочисленные работы посвящены развитию этого или аналогичного программного обеспечения для автоматического подсчета клеток [26, 27, 28].

Настоящая работа является еще одним «кирпичиком» этого строящегося здания компьютерной обработки данных биотестирования. Основным достоинством описываемой разработки (программа Paracount_7) мы видим применение функции вычитания фона, предшествующее процедурам контрастирования, пороговой обработки и подсчета контуров. Насколько нам известно, применительно к автоматическому подсчету клеток такой подход применен впервые, по крайней мере его нет ни в одной из процитированных работ. Этот подход не только улучшает работу программы применительно к «мутным» снимкам с многочисленными мелкими объектами, но и открывает возможность оценки подвижности инфузорий, что немаловажно для оценки качества объектов природной среды с помощью биотестирования.

Также следует отметить, что применительно к каждому набору задач и, тем более, к каждому набору используемой в эксперименте аппаратуры требуется индивидуальный подход в части подбора настроечных параметров. Мы создали свою подборку программного обеспечения, обладающую удобным и лаконичным интерфейсом, позволяющим решать все задачи подсчета инфузорий *Tr* (и не только *Tetrahymena pyriformis*) на снимках, получаемых с помощью описанной в экспериментальной части аппаратуры.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CONFLICT OF INTERESTS:

The authors declare no conflict of interests.

Список литературы:

1. Скурлатов, Ю. И., Дука, Г. Г., & Эрнестова, Л. С. (1983). Процессы токсикации и механизмы самоочищения природной воды в условиях антропогенных воздействий. *Изв. АН МССР «Серия «Биологические и химические науки», (5), 3–20.*
2. Леонова, И. Б., & Метленкин, Д. А. (2016). Биотестирование в оценке качества бутилированной питьевой воды. *Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения, (5), 43–48.*
3. Dell, H. A. (1954). Stages in the development of an arrested scan type microscopic particle counter. *British Journal of Applied Physics, 5(S3), S156–S161.* <https://doi.org/10.1088/0508-3443/5/S3/349>.
4. Lojk, J., Čibej, U., Karlaš, D., Šajn, L., & Pavlin, M. (2015). Comparison of two automatic cell-counting solutions for fluorescent microscopic images. *Journal of microscopy, 260(1), 107–116.* <https://doi.org/10.1111/jmi.12272>.
5. Peer, P., & Corzo, L. G. (2007). Local Pixel Value Collection Algorithm for Spot Segmentation in Two-Dimensional Gel Electrophoresis Research. *International Journal of Genomics, 2007(1), 089596.* <https://doi.org/10.1155/2007/89596>.
6. Kurnia, K. A., Sampurna, B. P., Audira, G., Juniardi, S., Vasquez, R. D., Roldan, M. J. M., ... & Hsiao, C. D. (2022). Performance Comparison of Five Methods for Tetrahymena Number Counting on the ImageJ Platform: Assessing the Built-in Tool and Machine-Learning-Based Extension. *International Journal of Molecular Sciences, 23(11), 6009.* <https://doi.org/10.3390/ijms23116009>.
7. Чеснокова, С. М., & Чугай, Н. В. (2008). Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды: учебное пособие: в 2 ч. Ч. 2: Методы биотестирования.
8. Черемных, Е. Г., & Воронина, Л. П. (2007). Автоматизация биотестирования почв на основе обработки изображения. *Вестник Московского университета. Серия 17: Почвоведение, (3), 47–50.*
9. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98; ПНД ФТ 14.1:2:3:4.3-99; ПНД ФТ 14.1:2:3:4.4-99
10. Кузьмич В.Н, Соколова С.А., Крайнюкова А.Н. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002.
11. Зурочка, А. В., Хайдуков, С. В., Кудрявцев, И. В., & Черешнев, В. А. (2018). Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. *Екатеринбург: РИО УрО РАН.*
12. Bergquist, P. L., Hardiman, E. M., Ferrari, V. C., & Winsley, T. (2009). Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles, 13(3), 389–401.* <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0236-4>.
13. Valeur, B., & Brochon, J. C. (Eds.). (2012). New trends in fluorescence spectroscopy: applications to chemical and life sciences (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
14. Korobchevskaya, K., Lagerholm, B. C., Colin-York, H., & Fritzsche, M. (2017, July). Exploring the potential of airyscan microscopy for live cell imaging. *In Photonics (Vol. 4, No. 3, p. 41).* MDPI. <https://doi.org/10.3390/photonics4030041>.
15. Hogg, W. R., & Coulter, W. H. (1971). *U.S. Patent No. 3,557,352.* Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
16. Zhang, W., Hu, Y., Choi, G., Liang, S., Liu, M., & Guan, W. (2019). Microfluidic multiple cross-correlated Coulter counter for improved particle size analysis. *Sensors and actuators B: Chemical, 296, 126615.* <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.05.092>.
17. Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical biochemistry, 473, 63–65.* <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.007>.

18. Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(sup1), S25-S30. <https://doi.org/10.2144/000112517>.
19. Farhan, A., Kurnia, K. A., Saputra, F., Chen, K. H. C., Huang, J. C., Roldan, M. J. M., ... & Hsiao, C. D. (2021). An opencv-based approach for automated cardiac rhythm measurement in zebrafish from video datasets. *Biomolecules*, 11(10), 1476. <https://doi.org/10.3390/biom11101476>.
20. Gallagher, S. R. (2014). Digital image processing and analysis with ImageJ. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 9(1), A-3C. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.eta03cs03>.
21. Колмогоров А. Н. Доклады Академии Наук СССР (1941) 31, 99 – 101.
22. Разумовский Н. К. Характер распределения содержания металлов в рудных месторождениях. Доклады Академии Наук СССР (1940) 28(9), 815–817.
23. Разумовский Н. К. (1948). Логарифмически-нормальный закон распределения вещества и его свойства. *Записки Ленинградского ордена Ленина Горного института. XX*, 105–107.
24. Ganas, K., Rakka, M., Vavalidis, T., & Nunes, C. (2010). Measuring batch fecundity using automated particle counting. *Fisheries Research*, 106(3), 570–574. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.09.016>.
25. Cai, Z., Chattopadhyay, N., Liu, W. J., Chan, C., Pignol, J.-P., & Reilly, R. M. (2011). Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting. *International Journal of Radiation Biology*, 87(11), 1135–1146. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.622033>.
26. Mussadiq, Z., Laszlo, B., Helyes, L., & Gyuricza, C. (2015). Evaluation and comparison of open source program solutions for automatic seed counting on digital images. *Computers and Electronics in Agriculture*, 117, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.08.010>.
27. Nichele, L., Persichetti, V., Lucidi, M., & Cincotti, G. (2020). Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting. *Osa Continuum*, 3(6), 1417-1427. <https://doi.org/10.1364/OSAC.393971>.
28. Danev, A., Yaneva, T., Bosakova-Ardenska, A., Gabrova, R., & Angelov, A. (2021). Software development for objective automatic counting of lactic acid bacterial colonies grown in MRS agar.

References:

1. Skurlatov, Yu. I., Duka, G. G., & Ernestova, L. S. (1983). Toxication processes and self-purification mechanisms of natural water under anthropogenic influences. *Izvestiya AN MSSR Series "Biological and chemical sciences"*, (5), 3–20.
2. Leonova, I. B., & Metlenkin, D. A. (2016). Bioassays in assessing the quality of bottled drinking water. *Modern science: current problems and solutions*. (5), 43–48.
3. Dell, H. A. (1954). Stages in the development of an arrested scan type microscopic particle counter. *British Journal of Applied Physics*, 5(S3), S156–S161. <https://doi.org/10.1088/0508-3443/5/S3/349>.
4. Lojk, J., Čibej, U., Karlaš, D., Šajn, L., & Pavlin, M. (2015). Comparison of two automatic cell-counting solutions for fluorescent microscopic images. *Journal of microscopy*, 260(1), 107-116. <https://doi.org/10.1111/jmi.12272>.
5. Peer, P., & Corzo, L. G. (2007). Local Pixel Value Collection Algorithm for Spot Segmentation in Two-Dimensional Gel Electrophoresis Research. *International Journal of Genomics*, 2007(1), 089596. <https://doi.org/10.1155/2007/89596>
6. Kurnia, K. A., Sampurna, B. P., Audira, G., Juniardi, S., Vasquez, R. D., Roldan, M. J. M., ... & Hsiao, C. D. (2022). Performance Comparison of Five Methods for Tetrahymena Number Counting on the ImageJ Platform: Assessing the Built-in Tool and Machine-Learning-Based Extension. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6009. <https://doi.org/10.3390/ijms23116009>.

7. Chesnokova, S. M., & Chugay, N. V. (2008). Biological methods for assessing the quality of environmental objects: a tutorial: in 2 parts. Part 2: Biotesting methods.
8. Cheremnykh, E.G., & Voronina, L.P. Automation of soil biotesting based on image processing. *Moscow Univ. Soil Sci. Bull.* 62, 159–162 (2007).
<https://doi.org/10.3103/S0147687407030088>.
9. PND FT 14.1:2:3:4.2-98 Methodology for determining water toxicity based on mortality and changes in fertility of daphnia.
10. Kuzmich V.N., Sokolova S.A., & Kraynyukova A.N. Guidelines for Determining the Toxicity of Water, Bottom Sediments, Pollutants, and Drilling Fluids by Biotesting. Moscow: REFIA, NIA-Priroda, 2002.
11. Zurochka, A. V., Khaidukov, S. V., Kudryavtsev, I. V., & Chereshev, V. A. (2018). Flow cytometry in biomedical research. Ekaterinburg: RIO UrO RAS.
12. Bergquist, P. L., Hardiman, E. M., Ferrari, B. C., & Winsley, T. (2009). Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles*, 13(3), 389–401.
<https://doi.org/10.1007/s00792-009-0236-4>.
13. Valeur, B., & Brochon, J. C. (Eds.). (2012). New trends in fluorescence spectroscopy: applications to chemical and life sciences (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
14. Korobchevskaya, K., Lagerholm, B. C., Colin-York, H., & Fritzsche, M. (2017, July). Exploring the potential of airyscan microscopy for live cell imaging. *In Photonics* 4(3), 41. MDPI. <https://doi.org/10.3390/photonics4030041>.
15. Hogg, W. R., & Coulter, W. H. (1971). *U.S. Patent No. 3,557,352*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
16. Zhang, W., Hu, Y., Choi, G., Liang, S., Liu, M., & Guan, W. (2019). Microfluidic multiple cross-correlated Coulter counter for improved particle size analysis. *Sensors and actuators B: Chemical*, 296, 126615. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.05.092>.
17. Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical biochemistry*, 473, 63–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.007>.
18. Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(sup1), S25–S30.
<https://doi.org/10.2144/000112517>.
19. Farhan, A., Kurnia, K. A., Saputra, F., Chen, K. H. C., Huang, J. C., Roldan, M. J. M., ... & Hsiao, C. D. (2021). An opencv-based approach for automated cardiac rhythm measurement in zebrafish from video datasets. *Biomolecules*, 11(10), 1476.
<https://doi.org/10.3390/biom11101476>.
20. Gallagher, S. R. (2014). Digital image processing and analysis with ImageJ. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 9(1), A-3C.
<https://doi.org/10.1002/9780470089941.eta03cs03>.
21. Kolmogorov A. N. (1941). *Soviet Mathematics*. 31, 99–101.
22. Razumovsky N. K. (1940). The nature of distribution of metal content in ore deposits. *Soviet Mathematics*. 28(9), 815–817.
23. Razumovsky N. K. (1948). Logarithmic-normal distribution law of matter and its properties. *Notes of the Leningrad Order of Lenin Mining Institute*. XX, 105–107.
24. Ganiyas, K., Rakka, M., Vavalidis, T., & Nunes, C. (2010). Measuring batch fecundity using automated particle counting. *Fisheries Research*, 106(3), 570–574.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.09.016>.
25. Cai, Z., Chattopadhyay, N., Liu, W. J., Chan, C., Pignol, J.-P., & Reilly, R. M. (2011). Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting. *International Journal of Radiation Biology*, 87(11), 1135–1146. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.622033>.
26. Mussadiq, Z., Laszlo, B., Helyes, L., & Gyuricza, C. (2015). Evaluation and comparison of open source program solutions for automatic seed counting on digital images. *Computers and Electronics in Agriculture*, 117, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2015.08.010>.

27. Nichele, L., Persichetti, V., Lucidi, M., & Cincotti, G. (2020). Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting. *Osa Continuum*, 3(6), 1417–1427. <https://doi.org/10.1364/OSAC.393971>.
28. Danev, A., Yaneva, T., Bosakova-Ardenska, A., Gabrova, R., & Angelov, A. (2021). Software development for objective automatic counting of lactic acid bacterial colonies grown in MRS agar.