

Оригинальная статья

УДК 57.017.4+004.932

<https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-3-301-313>

## ОБРАБОТКА ВИДЕОИЗОБРАЖЕНИЙ *DAPHNIA MAGNA* STRAUS (CLADOCERA, CRUSTACEA) КАК ОСНОВА АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

А. С. Олькова , Е. В. Медведева

Вятский государственный университет  
Россия, 610000, г. Киров, ул. Московская, д. 36

Поступила в редакцию 30.03.2023 г., после доработки 10.05.2023 г., принята 25.05.2023 г., опубликована 22.09.2023 г.

**Аннотация.** Компьютерная обработка видеоряда с тест-организмами является перспективным направлением развития биотестирования, так как значительно увеличивается пропускная способность методов в единицу времени и одновременно учитывается несколько тест-реакций. Цель работы – разработка и апробация автоматизированного способа учёта комплекса тест-функций *D. magna* для дальнейшей оценки токсичности водных сред. Видео с *D. magna* обрабатывали средствами языка программирования Python с применением библиотеки компьютерного зрения OpenCV. Разработанный программный алгоритм позволяет обнаруживать особей *D. magna* разного возраста, определять их линейные размеры, скорости и ускорения. Такой функционал, применённый к модельным группам *D. magna*, позволяет оценивать острую токсичность (по летальным и сублетальным эффектам) и хроническую токсичность проб (по количеству родившейся молоди и её физиологическим реакциям).


**Ключевые слова:** биотестирование, *Daphnia magna*, двигательная активность, алгоритмы обнаружения движущихся объектов

**Для цитирования.** Олькова А. С., Медведева Е. В. Обработка видеоизображений *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) как основа автоматизированных методов биотестирования // Поволжский экологический журнал. 2023. № 3. С. 301 – 313. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-3-301-313>

## ВВЕДЕНИЕ

Биотестирование использовалось для оценки качества окружающей среды за долго до появления компьютеров и цифровой техники. Первые методы биотестирования – визуальные оценки реакций тест-организмов – используются до сих пор, являются классическими и рекомендованы протоколами международных и национальных стандартов (ФР.1.39.2007.03222, 2007; ISO 6341:2012, 2012; OECD. Test No. 202, 2004). Вслед за ними появлялись приборы для экотоксикологического ана-

---

 Для корреспонденции. Кафедра экологии и природопользования Вятского государственного университета.

ORCID и e-mail адреса: Олькова Анна Сергеевна: <https://orcid.org/0000-0002-5798-8211>, [usr08617@vyatsu.ru](mailto:usr08617@vyatsu.ru); Медведева Елена Викторовна: <https://orcid.org/0000-0002-0677-1418>, [medvedeva@vyatsu.ru](mailto:medvedeva@vyatsu.ru).

лиза, в России получили распространение Биотокс-10М, Биотестер, Измеритель плотности суспензии, Флюорат. В аналитической работе (Kokkali, van Delft, 2014) обобщены данные по 60 видам приборов, позволяющих автоматизировать некоторые операции при биоанализах, большинство из них оценивают численность, флуоресценцию и биолюминесценцию одноклеточных тест-организмов, иммобилизацию многоклеточных организмов и только 5 приборов имеют возможность оценивать двигательную активность рыб и ракообразных.

Согласно этике по обращению с лабораторными животными, среди многоклеточных тест-организмов предпочтение отдается низшим ракообразным (Häder, 2018a, b). *Daphnia magna* – зоопланктонный организм, встречающийся в пресноводных экосистемах, космополит. В то же время дафнии – удобный модельный организм, который хорошо изучен и не менее успешно используется в экотоксикологических исследованиях, чем млекопитающие (Guilhermino et al., 2000). Физиологические реакции низших ракообразных являются ценными экспрессными тест-функциями для сравнения острой токсичности различных веществ (Pawlik-Skowrońska, Bownik, 2021).

В литературе имеется множество экотоксикологических сведений, полученных с помощью оценки тест-функции двигательной активности дафний и её производных (скорость, частота скачков и т.д.), но степень автоматизации обработки видеоданных не совершенна. Так, в работе (Pawlik-Skowrońska, Bownik, 2021), опирающейся на метод, описанный (Shimizu et al., 2002), положение дафнии определялось щелчком мыши по её изображению на одном видеокadre, затем программное обеспечение автоматически перемещало видеоклип к следующему кадру, то есть работа по отслеживанию организма проводилась вручную «покадровым методом». Этот же ручной покадровый метод, дополненный обработкой результатов с помощью программного обеспечения Tracker® 5.1.0 используется в исследовании (Szabelak, Bownik, 2021). В работе (Moison et al., 2012) длительность видеонаблюдения была 60 мин, что, вероятно, усложняло обработку данных.

Результаты использования технологии компьютерного зрения легли в основу программно-аппаратного комплекса «Анализатор токсичности TrackTox», который позволяет распознавать тест-организмы, оценивать скорость, пройденное расстояние за единицу времени, высоту плавания относительно дна кюветы, ориентацию организмов в пространстве, сложность траектории (фрактальная размерность) (Никитин и др., 2022; Nikitin et al., 2015). Предлагаемое время обработки видеоизображений, полученных на данном комплексе, составляет 30 мин. Характеристика метода может быть улучшена. Альтернативное развитие способов учёта тест-функций гидробионтов будет способствовать становлению автоматизированного этапа биотестирования и накоплению новых научных данных.

Цель данной работы – разработать автоматизированный способ учёта комплекса тест-функций *D. magna*, включающих сублетальные реакции (изменения двигательной активности), смертность и хронические эффекты (плодовитость особей) для дальнейшей оценки токсичности водных сред.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Тест-организмы и получение видеоряда с ними.* Для получения видеоизображений и их обработки использовали лабораторную культуру *D. magna*. В воду питьевого качества, долговременно используемую для культивирования *D. magna*, помещали тест-организмы – по одному и группами. При первичной апробации алгоритма обнаружения живого движущегося объекта работали с одной особью. Далее программу испытывали на модельных группах.

Дафнии помещались в стеклянный химический стакан с диаметром дна 3 см, уровень воды составлял 1.5 см. Стакан, в свою очередь, помещался в цилиндрическую камеру, по периметру которой была проложена светодиодная лента, создававшая одинаковый уровень освещения со всех сторон. Съемку начинали через 10 мин после манипуляций для нивелирования тактильного стресса организмов.

Видео были получены с помощью веб-камеры, закрепленной на штативе на высоте 20 см от поверхности воды. Время видеосъемки – 5 мин. Разрешение видео – 720×1080 пк, частота кадров – 25 кадр./с.

*Методы обработки видеоданных.* Для реализации алгоритма обнаружения живых движущихся организмов и оценки их параметров использовался язык программирования Python с применением библиотеки компьютерного зрения OpenCV.

Последовательно решались 3 основные задачи: обнаружение движущихся живых объектов на основе метода оценки фона, отслеживание объектов в последующих кадрах и определение их параметров.

Для улучшения визуального качества изображения и повышения точности обнаружения объектов сначала выполнялась предобработка изображения. Она включала методы гамма-коррекции и нерезкого маскирования, позволяющие выровнять яркость фоновых пикселей и повысить контраст небольших объектов (Гонсалес, Вудс, 2012).

Дальнейший алгоритм обнаружения живых организмов был реализован на основе метода вычитания фона. В качестве математической модели фона использовалась смесь гауссовых распределений (GMM), описанная в (Bouwman et al., 2008; Mathias et al., 2021). Данная модель адаптирована к изображениям с фиксированным или медленно меняющимся фоном и хорошо зарекомендовала себя для обнаружения движущихся объектов, в том числе находящихся под водой (Mathias et al., 2021).

В соответствии с моделью (Mathias et al., 2021), вероятность наблюдения текущего ( $k$ -го) значения яркости каждого пикселя определялась формулой:

$$P(X_k) = \sum_{j=1}^S w_j^k N(X_k | \mu_j^k, \sigma_j^k),$$

где  $X_k$  – это смоделированная функция распределения Гаусса,  $w_j^k, \mu_j^k, \sigma_j^k$  – вес, математическое ожидание и среднеквадратичное отклонение  $j$ -го распределения  $k$ -го наблюдения соответственно;  $N(X_k | \mu_j^k, \sigma_j^k)$  – функция плотности нормального распределения;  $S$  – количество распределений в смеси.

Для каждого пикселя последующего кадра на основе расстояния Махаланобиса (Bouwman et al., 2008) определялось, какому распределению соответствует новое значение. Затем по отношению  $w_j^k / \sigma_j^k$  принималось решение о принадлежности пикселей фону или объекту. Очевидно, что пиксели с малым весом и большим среднеквадратичным отклонением будут принадлежать движущимся объектам, а пиксели с большим средним и малым среднеквадратичным отклонением – фону.

Для последующих кадров выполняется обновление параметров распределений яркостей пикселей. Если предварительно полученная по  $k$ -кадрам нормализованная гистограмма существенно отличается от текущей, то эта гистограмма заменяется новой и смешанная модель фона перестраивается. Таким образом, алгоритм позволяет обнаружить подвижные объекты на изображениях, в том числе объекты, которые некоторое время были не подвижны, а потом продолжили движение.

Изображение после вычитания фона содержало небольшие фрагменты другой яркости (от одного до нескольких пикселей) как на фоновом поле, так и на объектах интереса. Для их устранения применяли морфологические операции размыкания (Opening) и замыкания (Closing) (Гонсалес, Вудс, 2012).

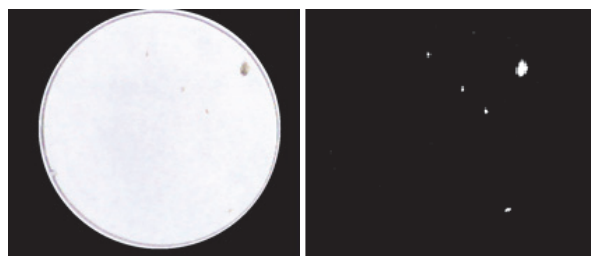
Предполагаемые объекты интереса выделяли прямоугольной рамкой, и им присваивали нумерованные метки. Для каждого объекта вычисляли координаты центров как среднеарифметическое значение координат составляющих его точек.

Для повышения точности и скорости работы алгоритма на последующих кадрах использовали алгоритм отслеживания объектов, основанный на дискриминационно-корреляционном фильтре с канальной и пространственной надежностью (DCF-CSRT Tracker) (Lukežič et al., 2018).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Программа обнаружения живых движущихся объектов.* Результат работы алгоритма вычитания фона с использованием смеси гауссовых распределений показан на рис. 1.

Программная обработка видеопоследовательностей позволяет выполнить: об-



*a / a*

*б / б*

**Рис. 1.** Внешний вид первоначального кадра видеоряда с *D. magna* (а) и после «вычитания фона» (б)

**Fig. 1.** Appearance of the raw frame from the video with *D. magna* (a) and that of the image after background subtraction (b)

наружение и подсчёт количества движущихся особей *D. magna*; вычисление площади движущегося объекта в различных проекциях с дальнейшим автоматическим выбором проекции с максимальным количеством пикселей, что характеризует результирующий размер дафнии. Оценка количества пикселей, принадлежащих живому организму, по множеству кадров позволит в дальнейшем определять морфо-

логические параметры объекта – длину и ширину, что также имеет диагностическое значение. Метод вычитания фона позволяет производить как ярко окрашенных дафний, так и частично лишенных пигментирования вследствие токсического воздействия:

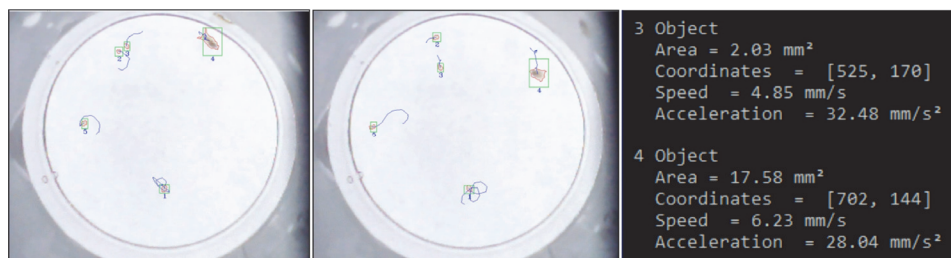
- оценку координат центров тест-организмов для дальнейшего расчета скорости и ускорения гидробионтов;
- оценку скорости движения организмов по измеренным координатам центров объектов в соседних кадрах с учетом кадровой частоты;
- оценку ускорения организмов – по быстрой изменению скорости организмов;
- визуализацию траектории движения – временной ряд координат центров живых объектов.

Скорость и ускорение движения организмов вычисляются в каждом втором кадре. На рис. 2 представлены варианты отражения обработки видеоданных с одной взрослой особью и четырьмя новорожденными особями *D. magna*.

Основные параметры тест-организмов выводятся на экран и могут быть использованы для дополнительной обработки массивов данных. Время обработки одного кадра – 110 мс, 5-минутной записи – 30 с.

*Характеристики живых движущихся объектов.* В таблице обобщены параметры *D. magna*, вычисленные с помощью разработанной программы.

Программа безошибочно определяла количество дафний, помещённых в экспериментальную ёмкость. Для небольшого количества особей эта операция легко выполняется визуально. Однако автоматизация процесса крайне необходима при большом потоке анализов, а также при подсчете молоди, родившейся в эксперименте по определению хронической токсичности пробы. Успешное обнаружение и оценка параметров как взрослых особей *D. magna*, так и суточной молоди, подтверждает возможность использования программы как для кратких экспериментов по определению острой токсичности, так и для продолжительных токсикологических испытаний на хроническую токсичность. Препятствий для отслеживания большего количества *D. magna* нет. В литературе имеются сведения об одновременном видеонаблюдении *D. magna* в количестве 50 штук (Nasyrova, Nikitin, 2020).



**Рис. 2.** Обнаружение живых объектов, их траектории и основные параметры  
**Fig. 2.** Detection of living objects, their trajectories and basic parameters

Соответствие параметров *D. magna*, оцениваемых автоматически, тест-реакциям и уровням наблюдаемых эффектов

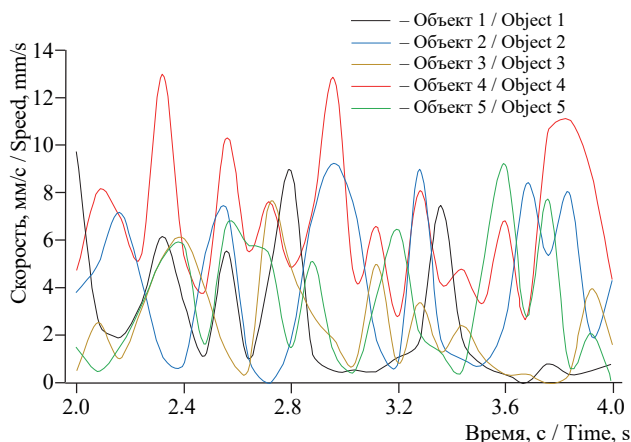
**Table.** Compliance of *D. magna* parameters estimated automatically with test reactions and observed effect levels

Параметр, оцениваемый программой / Parameter evaluated by the program	Тест-реакции / Test reactions	Уровень эффектов / Effect level	
Количество движущихся взрослых особей, шт. / Number of moving adults, pcs.	Выживаемость и смертность* / Survival and mortality	Летальные / Lethal	
Площадь, мм <sup>2</sup> / Area, mm <sup>2</sup>	Линейные размеры / Linear dimensions	Сублетальные (для первого импактного поколения) / Sublethal (for the first impact generation)	Хронические (для последующих поколений) / Chronic (for later generations)
Скорость, мм/с / Speed, mm/s	Двигательная активность / Motor activity		
Ускорение, мм <sup>2</sup> /с / Acceleration, mm <sup>2</sup> /s			
Количество движущейся молоди / Number of moving juveniles	Плодовитость / Fertility	Хронические / Chronic	

*Примечание.* \* – вычисляется с учетом разницы количества опытных особей, помещенных в тест-среду, и количества особей, обнаруженных после необходимой экспозиции.

*Note.* \* – the parameter is calculated taking into account the difference between the number of experimental individuals placed in the test environment and the number of individuals found after the required exposure.

Площадь движущихся дафний определялась по количеству выделенных пикселей. Для определения реальной площади изображение в пикселях соотносилось с размерами в пространстве. Зная, что реальный диаметр емкости для наблюдений равен 3 см, и то, что длина особи больше ширины в 1.5 раза, можно вычислить линейный размер (длину) каждой дафнии по формуле  $L = 2\sqrt{(3S/2\pi)}$ , где  $L$  – длина особи,  $S$  – площадь, мм<sup>2</sup>. Так, для взрослой особи (см. рис. 2)  $L = 2\sqrt{(3 \cdot 16.6/2\pi)} = 5.6$  мм. Для молодой особи  $L = 1.9 \pm 0.5$  мм.



**Рис. 3.** Скорость движения пяти *D. magna* в одной емкости  
**Fig. 3.** Movement speed of five *D. magna* in one container

Скорость и ускорение дафний могут быть самостоятельными тест-функциями, но, пользуясь классической терминологией, их можно отнести к двигательной активности особей. Скорость тест-организмов варьировала в широких пределах. Это объясняется скачкообразным характером движения дафний, что видно на рис. 3.

Вероятно, каждый максимальный пик на графиках связан со скач-

кообразным периодическим перемещением дафнии в воде, а промежуточные пики объясняются вращениями и поворотами рачков в пространстве.

На кадрах, показанных на рис. 3, ювенильные дафнии двигались со скоростью от 2.40 до 5.6 мм/с. Их средняя скорость составила  $3.2 \pm 0.8$  ( $M \pm \delta$ ). Взрослая особь двигалась быстрее – 6.68 мм/с, что вполне закономерно. Ускорения у молодых особей также были ниже, чем у взрослой особи:  $32.8 \pm 6.3$  по сравнению с  $45.7$  мм/с<sup>2</sup>. Безусловно, дисперсия значений и ошибка среднего уменьшится при возрастании количества наблюдаемых объектов.

Первичное тестирование программы в экспериментах с модельными токсикантами и реальными пробами показало, что предложенный метод чувствителен и экспрессен. Так, после суточной экспозиции *D. magna* в пробе подземной воды, в которой превышен норматив по содержанию бора в 20 раз, средняя скорость организмов составила  $5.0 \pm 0.9$  мм/с, а ускорение  $29.1 \pm 5.1$  мм/с<sup>2</sup>, что было меньше контрольных показателей в 1.5 и 1.4 раза соответственно ( $p < 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Смертность и плодовитость низших ракообразных являются основными тест-функциями, используемыми для определения токсичности, однако обнаружение тонких изменений, вызванных некоторыми химическими веществами в низких концентрациях или другими стресс-факторами, может потребовать более чувствительных биомаркеров (Bownik, 2017). Тесты на основе двигательной активности *D. magna* в настоящее время включают в токсикологические испытания новых пестицидов наряду с оценкой генотоксичности, уровня окислительного стресса и подавлением размножения (Zhang et al., 2023). С помощью тестов на изменение частоты сердечных сокращений и двигательной активности трех гидробионтов, включая *D. magna*, показано, что инсектициды карбарил и фенитроцион оказывают экологически значимое воздействие при концентрациях, ниже их допустимого уровня (Bedrossiantz et al., 2023). Имеются примеры низкой чувствительности *D. magna* в части изменения активности плавания: полистирольные нанопластики ( $0.05$  и  $0.5$  мкг/мл) не изменяли двигательную активность рачков в течение 21 дня (De Felice, 2022). При этом ученые соглашаются в необходимости автоматизированного учёта физиологических реакций тест-организмов и важности накопления научных данных о сублетальных реакциях на различные воздействия.

Алгоритмы, разработанные на основе программы Python и описанные в данной работе, позволяют оценивать несколько тест-функций, производных от физиологической активности дафний. Подходы, которые применялись для обработки видеопоследовательностей, соответствуют современным междисциплинарным методам, рекомендуемым для подобных операций (Häder, 2018a, b).

Оценка количества не иммобилизованных особей может осуществляться без видеозаписи, но не будет непрерывной. Перспектива оценки количества подвижных особей показана в работах, где токсиканты не действовали летально, но снижали время активного плавания рачков (Untersteiner et al., 2003; Ferrão-Filho et al., 2014).

Показанная в данной работе возможность отслеживания морфологических параметров *D. magna* также имеет важное диагностическое значение. Например, в работе (Shahmohamadloo et al., 2020) показано, что природные токсиканты микроцистины влияют на скорость соматического роста дафний. Такие параметры удобнее измерять не прямым микроскопированием, а бесконтактным и непрерывным видеонаблюдением за параметрами объектов.

Впоследствии анализ траекторий движения дафний и их сравнение с контрольными данными будет способствовать выделению аномальных моделей плавания. Нарушение координации *D. magna* в пространстве, дезориентация по отношению к источнику света свидетельствуют о нейротоксичности веществ (He et al, 2023). Использование высокосортной камеры позволит доработать программу в части учета дополнительных тест-функций: частоты сердечных сокращений дафний, взмахов конечностей. Камера с частотой кадров 200 в секунду позволяет фиксировать эти реакции *D. magna* и определять кардиотоксичность водных сред и веществ (Kwon et al., 2021).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы биотестирования до сих пор уступают по производительности химическим методам анализа. С помощью технологий автоматизированного учёта реакций лабораторных тест-организмов возможно добиться не только увеличения пропускной способности методов биотестирования, но и значительного увеличения числа оцениваемых тест-функций, что в итоге будет способствовать формированию и внедрению в практику методологии системного биотестирования.

В проведенном исследовании показаны возможности разработанного алгоритма и программы: обнаружение движущихся особей *D. magna* разного возраста, определение их линейных размеров, скорости и ускорения. Преимущества обнаружения подвижных взрослых и новорожденных особей заключаются в том, что может проводиться автоматическая оценка как острой токсичности проб – по количеству оставшихся в живых импактных особей, так и оценка хронической токсичности проб по плодовитости *D. magna* – благодаря обнаружению молодежи в функционале программы. Кроме того, показатели двигательной активности молодежи, рожденной в пробе, будут дополнительными тест-функциями при оценке хронического воздействия пробы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. М.: Техносфера, 2012. 1104 с.
- Никитин О. В., Насырова Э. И., Перевозчикова Е. В., Андреев П. А., Гизатуллин Д. Ю., Латыпова В. З. Оценка двигательной активности гидробионтов при помощи компьютерного зрения // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: материалы XX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Киров: Вятский государственный университет, 2022. С. 127 – 131.
- ФР 1.39.2007.03222. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.: АКВАРОС, 2007. 52 с.



- Bedrossiantz J., Faria M., Prats E., Barata C., Cachot J., Raldúa D.* Heart rate and behavioral responses in three phylogenetically distant aquatic model organisms exposed to environmental concentrations of carbaryl and fenitrothion // *Science of The Total Environment*. 2023. Vol. 865. Article number 161268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161268>
- Bouwman T., El Baf F., Vachon B.* background modeling using mixture of gaussians for foreground detection – a survey // *Recent Patents on Computer Science*. 2008. Vol. 1, iss. 3. P. 219 – 237. <https://doi.org/10.2174/1874479610801030219>
- Bownik A.* Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review // *Science of The Total Environment*. 2017. Vol. 601 – 602. P. 194 – 205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>
- De Felice B., Sugni M., Casati L., Parolini M.* Molecular, biochemical and behavioral responses of *Daphnia magna* under long-term exposure to polystyrene nanoplastics // *Environment International*. 2022. Vol. 164. Article number 107264. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107264>
- Ferrão-Filho A. S., Soares M. C., Lima R. S., Magalhães V. F.* Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (Cladocera) // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2014. Vol. 33. P. 223 – 229. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2420>
- Guilhermino L., Diamantino T., Silva M. C., Soares A. M. V. M.* Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000. Vol. 46, iss. 3. P. 357 – 362. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1916>
- Häder D.-P.* Historical development of bioassays // *Bioassays: Advanced Methods and Applications* / eds. D.-P. Häder, G. S. Erzinger. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018a. P. 41 – 49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00003-6>
- Häder D.-P.* Image analysis for bioassays – the basics // *Bioassays: Advanced Methods and Applications* / eds. D.-P. Häder, G. S. Erzinger. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018b. P. 69 – 98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00005-X>
- He Zh., Chen Y., Huo D., Gao J., Xu Y., Yang R., Yang Y., Yu G.* Combined methods elucidate the multi-organ toxicity of cylindrospermopsin (CYN) on *Daphnia magna* // *Environmental Pollution*. 2023. Vol. 324. Article number 121250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121250>
- ISO 6341:2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Geneva: International Organization for Standardization, 2012. 22 p.
- Kokkali V., van Delft W.* Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 61. P. 133 – 155. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.001>
- Kwon I. H., Kim I. Y., Heo M. B., Park J.-W., Lee S.-W., Lee T. G.* Real-time heart rate monitoring system for cardiotoxicity assessment of *Daphnia magna* using high-speed digital holographic microscopy // *Science of The Total Environment*. 2021. Vol. 780. Article number 146405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146405>
- Lukežič A., Vojtř T., Čehovin L., Matas J., Kristan M.* Discriminative correlation filter tracker with channel and spatial reliability // *International Journal of Computer Vision*. 2018. Vol. 126, iss. 8. <https://doi.org/10.1007/s11263-017-1061-3>
- Mathias A., Dhanalakshmi S., Kumar R., Narayanamoorthi R.* Underwater object detection based on bidimensional empirical mode decomposition and gaussian mixture model approach // *Ecological Informatics*. 2021. Vol. 66. Article number 101469. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2021.101469>
- Moison M., François G. S., Souissi S.* Effect of temperature on *Temora longicornis* swimming behaviour: Illustration of seasonal effects in a temperate ecosystem // *Aquatic Biology*. 2012. Vol. 16, iss. 2. P. 149 – 162. <https://doi.org/10.3354/ab00438>

Nasyrova E. I., Nikitin O. V. The swimming behavior of *Daphnia magna* ensemble in two-dimensional space from the diffusion motion point of view // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 459. Article number 042027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/459/4/042027>

Nikitin O. V., Petrova V. M., Latypova V. Z. Bioassay of pyrethroid insecticide esfenvalerate using fractal analysis of *Daphnia magna* motion // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. Vol. 6, № 6. P. 1729 – 1736.

OECD. 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test // OECD Guide-lines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 2004. 12 p.

Pawlik-Skowrońska B., Bownik A. Cyanobacterial anabaenopeptin-B, microcystins and their mixture cause toxic effects on the behavior of the freshwater crustacean *Daphnia magna* (Cladocera) // Toxicon. 2021. Vol. 198. P. 1 – 11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.023>

Shahmohammadloo R. S., Simmons D. B. D., Sibley P. K. Shotgun proteomics analysis reveals sub-lethal effects in *Daphnia magna* exposed to cell-bound microcystins produced by *Microcystis aeruginosa* // Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genomics and Proteomics. 2020. Vol. 33. Article number 100656. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100656>

Shimizu N., Ogino C., Kawanishi T., Hayashi Y. Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay // Environmental Toxicology. 2002. Vol. 17, iss. 5. P. 441 – 448.

Szabelak A., Bownik A. Behavioral and physiological responses of *Daphnia magna* to salicylic acid // Chemosphere. 2021. Vol. 270. Article number 128660. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128660>

Untersteiner H., Kahapka J., Kaiser H. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal copper stress – validation by image analysis // Aquatic Toxicology. 2003. Vol. 65, iss. 4. P. 435 – 442. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(03\)00157-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00157-7)

Zhang H., Ren X., Liu T., Zhao Y., Gan Y., Zheng L. The stereoselective toxicity of di-nitofuran to *Daphnia magna*: A systematic assessment from reproduction, behavior, oxidative stress and digestive function // Chemosphere. 2023. Vol. 327. Article number 138489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138489>

## Video image processing of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) as a basis for automated biotesting methods

A. S. Olkova ✉, E. V. Medvedeva

Vyatka State University  
36 Moskovskaya St., Kirov 610000, Russia

Received: March 30, 2023 / revised: May 10, 2023 / accepted: May 25, 2023 / published: September 22, 2023

**Abstract.** Computer processing of a video sequence with test organisms is a promising direction in the development of biotesting, as the throughput of methods per unit time increases significantly and several test reactions are taken into account simultaneously. The aim of the work is to develop and test an automated method for considering a complex of *D. magna* test functions for further assessment of the toxicity of aquatic environments. Videos with *D. magna* were processed using the Python programming language and the OpenCV computer vision library. The developed algorithm makes it possible to detect *D. magna* individuals of different ages, to determine their linear dimensions, velocities and accelerations. This functionality, applied to model groups of *D. magna*, makes it possible to assess the acute toxicity (by lethal and sublethal effects) and chronic toxicity of samples (by the number of juveniles born and their physiological reactions).

**Keywords:** biotesting, *Daphnia magna*, locomotor activity, algorithms for detecting moving objects

**For citation:** Olkova A. S., Medvedeva E. V. Video image processing of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) as a basis for automated biotesting methods. *Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2023, no. 3, pp. 301–313 (in Russian). <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2023-3-301-313>

## REFERENCES

- Gonzalez R., Woods R. *Digital Image Processing*. Moscow, Tekhnosfera Publ., 2012. 1104 p. (in Russian).
- Nikitin O. V., Nasyrova E.I., Perevozchikova E. V., Andreev P. A., Gizatullin D. Yu., Latypova V. Z. Evaluation of the motor activity of hydrobionts using computer vision. *Biodiagnostika sostoianiia prirodnnykh i prirodno-tekhnogennykh sistem: materialy XX Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem* [Biodiagnostics of the State of Natural and Natural-Technogenic Systems: Proceedings of the XX All-Russian Scientific-Practical Conference With International Participation]. Kirov, Vyatka State University Publ., 2022, pp. 127–131 (in Russian).
- FR.1.39.2007.03222. *Biological Control Methods. Methods of Determining the Toxicity of Water and Water Extracts from Soils, Sewage Sludge, Waste Mortality and Fertility Change in Daphnia*. Moscow, Akvaros, 2007. 52 p. (in Russian).
- Bedrossiantz J., Faria M., Prats E., Barata C., Cachot J., Raldúa D. Heart rate and behavioral responses in three phylogenetically distant aquatic model organisms exposed to environmental

---

✉ Corresponding author. Department of Ecology and Nature Management of the Vyatka State University, Russia.

ORCID and e-mail addresses: Anna S. Olkova: <https://orcid.org/0000-0002-5798-8211>, [usr08617@vyatsu.ru](mailto:usr08617@vyatsu.ru); Elena V. Medvedeva: <https://orcid.org/0000-0002-0677-1418>, [medvedeva@vyatsu.ru](mailto:medvedeva@vyatsu.ru).

concentrations of carbaryl and fenitrothion. *Science of The Total Environment*, 2023, vol. 865, article number 161268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161268>

Bouwman T., El Baf F., Vachon B. background modeling using mixture of gaussians for foreground detection – a survey. *Recent Patents on Computer Science*, 2008, vol. 1, iss. 3, pp. 219–237. <https://doi.org/10.2174/1874479610801030219>

Bownik A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, 2017, vol. 601–602, pp. 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>

De Felice B., Sugni M., Casati L., Parolini M. Molecular, biochemical and behavioral responses of *Daphnia magna* under long-term exposure to polystyrene nanoplastics. *Environment International*, 2022, vol. 164, article number 107264. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107264>

Ferrão-Filho A. S., Soares M. C., Lima R. S., Magalhães V. F. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (Cladocera). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, vol. 33, pp. 223–229. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2420>

Guilhermino L., Diamantino T., Silva M. C., Soares A. M. V. M. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, vol. 46, iss. 3, pp. 357–362. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1916>

Häder D.-P. Historical development of bioassays. In: D.-P. Häder, G. S. Erzinger, eds. *Bioassays: Advanced Methods and Applications*. Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 2018a, pp. 41–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00003-6>

Häder D.-P. Image analysis for bioassays – the basics. In: D.-P. Häder, G. S. Erzinger, eds. *Bioassays: Advanced Methods and Applications*. Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 2018b, pp. 69–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811861-0.00005-X>

He Zh., Chen Y., Huo D., Gao J., Xu Y., Yang R., Yang Y., Yu G. Combined methods elucidate the multi-organ toxicity of cylindrospermopsin (CYN) on *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 2023, vol. 324, article number 121250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121250>

ISO 6341:2012. *Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test*. Geneva, International Organization for Standardization, 2012. 22 p.

Kokkali V., van Delft W. Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 2014, vol. 61, pp. 133–155. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.001>

Kwon I. H., Kim I. Y., Heo M. B., Park J.-W., Lee S.-W., Lee T. G. Real-time heart rate monitoring system for cardiotoxicity assessment of *Daphnia magna* using high-speed digital holographic microscopy. *Science of The Total Environment*, 2021, vol. 780, article number 146405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146405>

Lukežić A., Vojir T., Čehovin L., Matas J., Kristan M. Discriminative correlation filter tracker with channel and spatial reliability. *International Journal of Computer Vision*, 2018, vol. 126, iss. 8. <https://doi.org/10.1007/s11263-017-1061-3>

Mathias A., Dhanalakshmi S., Kumar R., Narayanamoorthi R. Underwater object detection based on bidimensional empirical mode decomposition and gaussian mixture model approach. *Ecological Informatics*, 2021, vol. 66, article number 101469. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2021.101469>

Moison M., François G. S., Souissi S. Effect of temperature on *Temora longicornis* swimming behaviour: Illustration of seasonal effects in a temperate ecosystem. *Aquatic Biology*, 2012, vol. 16, iss. 2, pp. 149–162. <https://doi.org/10.3354/ab00438>

Nasyrova E. I., Nikitin O. V. The swimming behavior of *Daphnia magna* ensemble in two-dimensional space from the diffusion motion point of view. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, vol. 459, article number 042027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/459/4/042027>

Nikitin O. V., Petrova V. M., Latypova V. Z. Bioassay of pyrethroid insecticide esfenvalerate using fractal analysis of *Daphnia magna* motion. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2015, vol. 6, no. 6, pp. 1729–1736.

OECD. 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. acute immobilisation test. *OECD Guide-lines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris, OECD Publishing, 2004. 12 p.

Pawlik-Skowrońska B., Bownik A. Cyanobacterial anabaenopeptin-B, microcystins and their mixture cause toxic effects on the behavior of the freshwater crustacean *Daphnia magna* (Cladocera). *Toxicon*, 2021, vol. 198, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.023>

Shahmohamadloo R. S., Simmons D. B. D., Sibley P. K. Shotgun proteomics analysis reveals sub-lethal effects in *Daphnia magna* exposed to cell-bound microcystins produced by *Microcystis aeruginosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, vol. 33, article number 100656. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100656>

Shimizu N., Ogino C., Kawanishi T., Hayashi Y. Fractal analysis of *Daphnia magna* motion for acute toxicity bioassay. *Environmental Toxicology*, 2002, vol. 17, iss. 5, pp. 441–448.

Szabelak A., Bownik A. Behavioral and physiological responses of *Daphnia magna* to salicylic acid. *Chemosphere*, 2021, vol. 270, article number 128660. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128660>

Untersteiner H., Kahapka J., Kaiser H. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal copper stress – validation by image analysis. *Aquatic Toxicology*, 2003, vol. 65, iss. 4, pp. 435–442. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(03\)00157-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00157-7)

Zhang H., Ren X., Liu T., Zhao Y., Gan Y., Zheng L. The stereoselective toxicity of dinotefuran to *Daphnia magna*: A systematic assessment from reproduction, behavior, oxidative stress and digestive function. *Chemosphere*, 2023, vol. 327, article number 138489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138489>