

УДК: 577.3

**Комплексный анализ воздействия ионов меди  
на первичные процессы фотосинтеза *Scenedesmus  
quadricauda* по результатам измерений флуоресценции  
хлорофилла *a* в суспензии и на одиночных клетках**

**С. К. Пирутин<sup>1,2</sup>, М. А. Шанк<sup>1,2,a</sup>, Ш. Цзя<sup>1,2</sup>, И. В. Конюхов<sup>2</sup>,  
Д. А. Тодоренко<sup>2</sup>, Р. Н. Червицов<sup>2</sup>, П. В. Фурсова<sup>2</sup>, Л. Ф. Кабашникова<sup>3</sup>,  
Т. Ю. Плюснина<sup>2</sup>, С. С. Хрущев<sup>2,b</sup>, Г. Ю. Ризниченко<sup>2</sup>, А. Б. Рубин<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне,

Китай, 518172, провинция Гуандун, район Лунган, г. Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюэюань, д. 1

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

<sup>3</sup> Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, д. 27

E-mail: <sup>a</sup> [mikhailshank@gmail.com](mailto:mikhailshank@gmail.com), <sup>b</sup> [styx@biophys.msu.ru](mailto:styx@biophys.msu.ru)

Получено 25.03.2025, после доработки — 06.04.2025.  
Принято к публикации 10.04.2025.

С помощью комплекса биофизических и математических методов исследовано влияние ионов меди на первичные процессы фотосинтеза пресноводной микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*. Проведена оценка воздействия меди (0,1–10 мкМ  $\text{CuSO}_4$ ) по индукционным кривым флуоресценции хлорофилла *a*, полученным как на суспензии клеток, так и на отдельных клетках водорослей после инкубации в световых и темных условиях. Установлено, что медь оказывает дозозависимое воздействие на фотосинтетический аппарат микроводорослей. Низкие (0,1 мкМ) концентрации  $\text{CuSO}_4$  по ряду параметров оказывают стимулирующее воздействие, тогда как концентрация 10 мкМ приводила к существенным нарушениям функционирования фотосистемы II. Анализ флуоресценции одиночных клеток оказался более чувствительным по сравнению с традиционными измерениями на суспензиях, позволив выявить гетерогенность реакции клеток на действие  $\text{CuSO}_4$ . Анализ кинетики быстрой флуоресценции хлорофилла *a* (JP-тест) показал, что наибольшую чувствительность к воздействию меди проявили параметры  $\delta_{Ro}$  и  $\varphi_{Ro}$ , которые достоверно отличались от контроля при воздействии не только высокой, но и средней концентрации (1 мкМ). При инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в световых условиях снижение фотохимической активности клеток было менее выражено, чем в условиях темновой инкубации. Нормирование данных по интенсивности начальной и максимальной флуоресценции на оптическую плотность суспензии при  $\lambda = 455$  нм значительно повысило чувствительность метода и позволило более точно интерпретировать эти данные. Использование  $L_1$ -регуляризации (LASSO) по методу наименьших углов (LARS) для спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации индукционной кривой позволило выявить ее временные характеристики. Результаты математической обработки полученных данных дают основание предположить, что действие ионов меди приводит к увеличению нефотохимического тушения флуоресценции, являющегося защитным механизмом рассеивания избыточной энергии возбуждения. Наблюдаемая гетерогенность реакций отдельных клеток водорослей на воздействие меди, по-видимому, является важным адаптационным механизмом, позволяющим популяции сохранять жизнеспособность в условиях стресса. Полученные данные подтверждают перспективность использования методов флуоресцентного анализа для ранней диагностики стрессовых воздействий тяжелых металлов на фотосинтезирующие организмы.

Ключевые слова: *Scenedesmus quadricauda*, ионы меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ), флуоресценция хлорофилла *a*, фотосистема II (ФСII), JP-тест, квантовый выход фотохимического преобразования энергии ( $\frac{F_v}{F_m}$ ), микрофлуориметрия, нефотохимическое тушение, нормировка данных, спектральная мультиэкспоненциальная аппроксимация

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М. В. Ломоносова.

UDC: 577.3

## Comprehensive analysis of copper ions effect on the primary processes of photosynthesis in *Scenedesmus quadricauda* based on chlorophyll *a* fluorescence measurements in suspension and on single cells

S. K. Pirutin<sup>1,2</sup>, M. A. Shank<sup>1,2,a</sup>, Sh. Jia<sup>1,2</sup>, I. V. Konyukhov<sup>2</sup>,  
D. A. Todorenko<sup>2</sup>, R. N. Chervitsov<sup>2</sup>, P. V. Fursova<sup>2</sup>, L. F. Kabashnikova<sup>3</sup>,  
T. Yu. Plusnina<sup>2</sup>, S. S. Khrushev<sup>2,b</sup>, G. Yu. Riznichenko<sup>2</sup>, A. B. Rubin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Shenzhen MSU-BIT University,  
1 International University Park Road, Dayun New Town, Shenzhen, Longgang District, Guangdong Province,  
518172, China

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,  
1/12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia

<sup>3</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,  
27 Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Belarus

E-mail: <sup>a</sup> mikhailshank@gmail.com, <sup>b</sup> styx@biophys.msu.ru

*Received 25.03.2025, after completion – 06.04.2025.  
Accepted for publication 10.04.2025.*

The effect of copper ions on the primary processes of photosynthesis in freshwater microalgae *Scenedesmus quadricauda* was studied using a set of biophysical and mathematical methods. Chlorophyll *a* fluorescence transients were recorded both in cell suspensions and at the level of single cells after incubation at copper concentrations of 0.1–10  $\mu\text{M}$  under light and dark conditions. It was found that copper has a dose-dependent effect on the photosynthetic apparatus of microalgae. At low copper concentration (0.1  $\mu\text{M}$ ), a stimulating effect on a number of studied parameters was observed, whereas significant disruption of Photosystem II activity was detected at 10  $\mu\text{M}$ . The method of analyzing fluorescence of single cells proved to be more sensitive compared to traditional suspension measurements, allowing the detection of heterogeneous cellular responses to the toxicant. Analysis of chlorophyll *a* fast fluorescence kinetics showed that the JIP-test parameters  $\delta_{Ro}$  and  $\varphi_{Ro}$  were the most sensitive to copper exposure and were significantly different from the control when exposed not only to high but also to medium (1  $\mu\text{M}$ ) copper concentrations. The decrease in photochemical activity of cells during light incubation was less pronounced compared to dark conditions. The application of data normalization to optical density at  $\lambda = 455 \text{ nm}$  significantly increased the sensitivity of the method and accuracy of result interpretation. The use of  $L_1$ -regularization (LASSO) by the least angles method (LARS) for the spectral multi-exponential approximation of the fluorescence transients allowed us to reveal their temporal characteristics. Mathematical analysis of the obtained data suggested that copper exposure leads to increased non-photochemical quenching of fluorescence, which serves as a protective mechanism for dissipating excess excitation energy. The revealed heterogeneity of cellular responses to copper action may have important ecological significance, ensuring the survival of part of the population under stress conditions. The obtained data confirm the promise of using fluorescent analysis methods for early diagnosis of heavy metal stress effects on photosynthesizing organisms.

Keywords: *Scenedesmus quadricauda*, copper ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ), chlorophyll fluorescence, photosystem II (PSII), JIP-test, photochemical quantum yield ( $\frac{F_v}{F_m}$ ), microfluorimetry, non-photochemical quenching, data normalization, spectral multi-exponential approximation

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2025, vol. 17, no. 2, pp. 293–322 (Russian).

The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

## 1. Введение

Загрязнение водных экосистем медью и другими тяжелыми металлами представляет серьезную экологическую проблему, обусловленную их токсическим действием на водные организмы [Spain, Plöhn, Funk, 2021; Li et al., 2022]. Микроводоросли являются чувствительными индикаторами загрязнения тяжелыми металлами [Cavalletti et al., 2022]. Мониторинг состояния популяций микроводорослей имеет большое значение для оценки экологического благополучия водных экосистем [Gu et al., 2022]. Особой чувствительностью к токсикантам обладает фотосинтетический аппарат данных организмов [Yong et al., 2018]. Первые его реакции на загрязнения возникают до того, как изменяется численность и морфология клеток микроводорослей. Для ранней диагностики повреждений фотосинтетического аппарата наиболее перспективными являются биофизические методы, основанные на регистрации флуоресценции хлорофилла *a* [Gan et al., 2023; Singh, Kumar, Soni, 2022], позволяющие оценивать состояние фотосинтетического аппарата микроводорослей — одной из главных «мишеней» воздействия тяжелых металлов [Rocha, Parrish, Espíndola, 2021; Dong et al., 2020]. Применение математических моделей и методов математической обработки этих экспериментальных данных предоставляет возможность анализа результатов по изменению скорости фотосинтетического электронного транспорта на отдельных его участках.

Для изучения механизмов действия загрязняющих веществ и их влияния на экосистемы важны лабораторные исследования токсичности таких веществ на модельных организмах [Fawaz, Kamareddine, Salam, 2019]. Микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* (*S. quadricauda*) широко используется в биотестировании благодаря своей чувствительности к токсикантам и быстрому росту [Dong et al., 2020; Acharya, Saify, 2012]. Она также включена в методики государственного экологического контроля [Методика выполнения измерений...].

Токсическое действие ионов меди связано с повреждением клеточных мембран, ингибированием ферментов и генерацией активных форм кислорода [Cavalletti et al., 2022; Yong et al., 2018; Wang, Sathasivam, Ki, 2017]. Медь может также взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами, нарушая их функции [Kovacic et al., 2010]. На уровне фотосинтетического аппарата влияние ионов меди проявляется в снижении эффективности фотосинтеза и повреждении реакционных центров (РЦ) [Rocha, Parrish, Espíndola, 2021; Gan et al., 2023; Маторин, Рубин, 2012]. Показано, что параметры индукционных кривых быстрой флуоресценции хлорофилла *a* (ОИР-кривые, которые отражают изменения флуоресценции хлорофилла *a* во времени после включения интенсивного света), являются довольно чувствительными маркерами присутствия ионов меди в среде [Singh, Kumar, Soni, 2022; Dong et al., 2020; Gan et al., 2023; Маторин, Рубин, 2012]. Наиболее часто используемыми параметрами являются  $\frac{F_v}{F_m}$  (максимальный квантовый выход фотосистемы II (ФСII)) и  $PI_{ABS}$  (индекс производительности ФСII).

При высоких концентрациях ионов меди наблюдается снижение фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции, что может указывать на инактивацию РЦ ФСII и повреждение механизмов фотозащиты [Rocha, Parrish, Espíndola, 2021; Salem, 2014], также отмечаются морфологические изменения клеток [Acharya, Saify, 2012; Acharya et al., 2014]. Действие же относительно низких концентраций ионов меди неоднозначно и в отдельных случаях оказывает некоторое стимулирующее влияние на клетки [Dauda, Lombardi, 2023; Xu et al., 2021]. Известно, что фотосинтетический электронный транспорт у древнейших фототрофных организмов не использует медьсодержащие соединения, в то время как фотосинтез у высших растений невозможен без синтеза медьсодержащего белка пластоцианина, необходимого для фотосинтетического электронного транспорта [Choi, Davidson, 2011; Redinbo, Yeates, Merchant, 1994]. Некоторые цианобактерии и эукариотические водоросли могут обходиться без ионов меди и использовать в фотосинтетическом электронном транспорте гемсодержащий белок цитохром  $c_6$  (который хоть

и синтезируется у некоторых высших растений, но утрачивает электрон-транспортную функцию), однако переключаются на использование пластоцианина при наличии меди в среде [De la Rosa et al., 2006; García-Cañas et al., 2021; Miramar et al., 2003]. Тем не менее ионы меди являются специфическим токсикантом для большинства микроводорослей, в связи с чем медный купорос  $\text{CuSO}_4$  и другие медьсодержащие соединения применяются для предотвращения цветения водоемов, а также обрастания деревьев и других высших растений микроводорослями [Haughey, 2000; Van Hullebusch et al., 2003].

Явление индукции флуоресценции хлорофилла *a*, то есть немонотонное изменение интенсивности флуоресценции во времени при освещении адаптированных к темноте образцов, было открыто Каутским и Хиршем [Kautsky, Hirsch, 1931]. В связи с высокой сложностью флуоресцентных сигналов возникает необходимость применения математических методов для извлечения информации и дальнейшей интерпретации этих сигналов. К числу таких методов относятся как простые подходы, например нормирование сигнала на оптическую плотность суспензии с последующим расчетом удельных параметров флуоресценции, так и методы повышенной сложности, требующие использования специализированных алгоритмов. Широкое распространение в исследованиях получил ЛР-тест [Strasser, Strasser, 1995; Strasser, Tsimilli-Michael, Srivastava, 2004], который позволяет оценить функциональную активность и эффективность стадий переноса электронов в различных звеньях фотосинтетической электрон-транспортной цепи. В кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* выделяют несколько фаз, известных как переходы *O-J-I-P*, отражающие последовательное восстановление переносчиков электронов в электрон-транспортной цепи, главным образом в ФСII. Начальный уровень флуоресценции (уровень *O*,  $F_o$ ) соответствует интенсивности при открытых РЦ, когда хинонный акцептор  $Q_A$  находится в окисленном состоянии. Участок *O-J* обусловлен светоиндуцированным восстановлением первичного акцептора ФСII  $Q_A$ , на этой стадии скорость переноса электронов в пул пластохинонов (*PQ*) пренебрежимо мала. Последующие фазы *J-I-P* отражают дальнейшее накопление восстановленного  $Q_A$  и характеризуют восстановления вторичного акцептора ФСII  $Q_B$  и пула *PQ*, а также последующих акцепторов электрона: цитохромного  $b_6f$ -комплекса, пластоцианина, ФСI и ферредоксина [Stirbet, Govindjee, 2011]. Индукционная кривая микроводорослей достигает своего максимума при  $\sim 200$  мс, когда все переносчики электрона в фотосинтетической ЭТЦ переходят в восстановленное состояние (уровень *P*,  $F_m$ ). В стандартном ЛР-тесте для характеристики отдельных стадий переноса электрона используются интенсивности флуоресценции в фиксированные моменты времени после включения света, которые были определены эмпирически как точки перегиба индукционных кривых в полулогарифмическом масштабе. Для повышения точности получаемых с помощью ЛР-теста оценок параметров был предложен модифицированный подход, позволяющий уточнить положения точек перегиба индукционных кривых путем анализа производных вдоль кривой [Akinyemi et al., 2023].

Еще один подход к анализу индукционных кривых заключается в представлении этих кривых в виде суммы нескольких показательных функций. Первоначально предложено использовать разложение нарастающего участка кривой на две или три экспоненты с помощью методов нелинейной регрессии [Pospíšil, Dau, 2000; Boisvert, Joly, Carpentier, 2006; Antal, Rubin, 2008]. В дальнейшем был разработан метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации [Плюснина и др., 2015], в котором происходит автоматическое выявление числа экспоненциальных фаз нарастания флуоресценции за счет применения алгоритма линейной регрессии с ограничением величины предэкспоненциальных множителей неотрицательными значениями [Antal et al., 2019; Antal et al., 2025; Plyusnina et al., 2020; Плюснина и др., 2019].

Дополнительную информацию о переходных процессах в фотосинтетическом аппарате можно получить, применяя подход, основанный на вычислении разницы между дважды нормированными индукционными кривыми, зарегистрированными в контрольных условиях и при



экспериментальном воздействии. Под двойной нормировкой подразумевается преобразование вида  $\frac{F_t - F_A}{F_B - F_A}$ , где  $F_t$  — интенсивность флуоресценции в произвольный момент времени, а  $F_A$  и  $F_B$  — интенсивности, принимаемые за ноль и за единицу соответственно. Может применяться нормировка индукционных кривых на минимальное и максимальное значение всей кривой ( $F_A = F_o$ ,  $F_B = F_m$ , такую нормировку часто называют нормировкой на переменную флуоресценцию) либо же нормировка на минимальное и максимальное значение отдельной фазы индукции флуоресценции например,  $OJ$  ( $F_A = F_o$ ,  $F_B = F_j$ ). Такой подход позволяет при описании формы индукционной кривой выделить дополнительные полосы ( $L$ ,  $K$ ,  $H$  и  $G$ ) флуоресценции, которые коррелируют с функциональным состоянием компонентов электрон-транспортной цепи [Strasser et al., 2007; Plyusnina et al., 2020; Antunović Dunić et al., 2023].

Наиболее полная интерпретация переходных процессов в фотосинтетическом аппарате может быть получена с помощью математического моделирования. Однако разработка модели, подходящей для конкретной задачи, и определение ее параметров по наблюдаемой кинетике остаются сложной задачей [Ризниченко и др., 2022; Lyu, Lazár, 2024]. Для выявления связанных с действием неблагоприятных факторов среды особенностей индукционных кривых также могут быть использованы модели, основанные на искусственных нейронных сетях, а также других методах машинного обучения [Хрущев и др., 2021; Khruschev et al., 2022].

Большинство модельных токсико-экологических исследований проводятся на клеточных суспензиях, однако индивидуальные клетки могут отличаться по чувствительности к токсикантам [Riznichenko et al., 1996; Volgusheva et al., 2023; Волгушева, Конюхов, Антал, 2024]. Это создает риск «ошибки выжившего», когда сигнал от устойчивых к токсиканту клеток маскирует сигнал от чувствительных к токсиканту клеток. Поэтому важно изучать воздействие токсикантов не только в суспензии, но и на одиночных клетках.

Цель данной работы — с помощью комплекса математических и биофизических методов исследовать влияние ионов меди на первичные процессы фотосинтеза микроводоросли *S. quadricauda*. Задачи включали в себя оценку поглощения света пигментами фотосинтетических мембран микроводорослей и параметров флуоресценции хлорофилла  $a$  для исследования изменений в РЦ ФСII и в цепи транспорта электронов при воздействии ионов меди в диапазоне микромолярных концентраций. Исследование проводилось на суспензиях и одиночных клетках при действии ионов меди в световых и темновых условиях инкубации.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Культивирование и обработка микроводорослей ионами меди

Зеленую хлорококковую микроводоросль *S. quadricauda* культивировали в течение четырех дней асептически на среде Успенского в конических колбах Эрленмейера при следующих условиях: температура  $23 \pm 1$  °C, постоянное перемешивание на шейкере (120 об/мин), непрерывное освещение люминесцентными лампами (плотность потока фотонов (ППФ) —  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) до достижения количества клеток  $3\text{--}4 \cdot 10^6 \text{ клеток} \cdot \text{мл}^{-1}$  (поздняя логарифмическая фаза роста). На 4-й день роста культуру разводили свежей средой Успенского до конечного значения абсорбции  $OD_{678}$  0,04 (примерно  $1,5 \cdot 10^5 \text{ клеток} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), чтобы избежать самозатенения и реабсорбции флуоресценции, и помещали в прозрачные пробирки объемом 15 мл. Затем в образцы добавляли  $\text{CuSO}_4$  для достижения концентрации 0,1, 1 и 10 мкМ и культивировали в течение 2 и 24 ч в условиях, описанных выше, при постоянном освещении ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  или в темноте. Для исследования долговременного влияния ионов меди на рост культуры аналогичным образом готовили образцы объемом 15 мл с концентрацией клеток  $2,5 \cdot 10^5 \text{ клеток} \cdot \text{мл}^{-1}$  и культивировали в течение восьми суток в условиях, описанных выше, при постоянном освещении

ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Подсчет численности клеток проводили каждые сутки в течение восьми суток с помощью камеры Горяева, по три повторности для каждого образца.

## 2.2. Измерение спектров поглощения

Спектры ослабления света суспензией клеток  $A(\lambda)$  регистрировали в диапазоне 400–800 нм в единицах оптической плотности на однолучевом спектрофотометре, оснащенный интегрирующей сферой для уменьшения потерь света в мутных образцах. Использовали кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см. В качестве источника света и детектора света использовали галогенную лампу и CCD-спектрометр (USB2000, Ocean Optics, США) соответственно. Для оценки истинного поглощения применялась упрощенная поправка на рассеяние. Для каждого спектра ослабления  $A(\lambda)$  оценивали значение ослабления на 750 нм  $A(750)$ , т. е. в области, где поглощение минимально, и вычитали его из полученного спектра ослабления. Полученный спектр  $OD_{(\lambda)} = A(\lambda) - A(750)$  далее будет называться спектром поглощения. Изменения содержания хлорофилла  $a$  и каротиноидов отслеживались *in vivo* по значениям поглощения  $OD_{678}$  и  $OD_{480}$  соответственно.

## 2.3. Измерение флуоресценции хлорофилла $a$

**2.3.1. Кривые индукции флуоресценции** хлорофилла  $a$  регистрировали в суспензиях водорослей, адаптированных к темноте (в течение 5 мин до начала измерения), с помощью флуориметра AquaPen-C AP-C 110 (Photon Systems Instruments, Чехия). ППФ и длительность вспышки синего актиночного света ( $\lambda = 455 \text{ нм}$ ) составляли  $3000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и 2 с соответственно. Кинетику светоиндуцированной флуоресценции хлорофилла  $a$  анализировали с помощью JIP-теста, предложенного в работах [Strasser, Strasser, 1995; Strasser, Tsimilli-Michael, Srivastava, 2004]. Описание рассчитываемых с помощью JIP-теста параметров приведено в таблице 1.

Для уточнения механизмов действия ионов меди на фотохимический квантовый выход анализировали отдельно, как изменяется величина флуоресценции  $F_o$  (влияние на фотохимическое тушение антенны со стороны открытых реакционных центров) и как изменяется величина  $F_m$  (влияние на нефотохимическое тушение, тепловые потери энергии). Чтобы сделать это в условиях культивирования, где общее содержание фотосинтетических пигментов в суспензии заметно изменяется с течением времени, мы рассчитали удельные значения  $F_o^*$  и  $F_m^*$ , поделив исходные  $F_o$  и  $F_m$  с прибора AquaPen-C AP-C 110 на величину  $OD_{455}$  того же образца [Padhi et al., 2021; Плюснина и др., 2019]. В данном случае длина волны 455 нм соответствует длине волны возбуждающего света при измерениях флуоресценции, а величина  $OD_{455}$  пропорциональна количеству световой энергии, поглощенной образцом с клетками водорослей. Такое нормирование сигналов флуоресценции убирает явную зависимость  $F_o$  и  $F_m$  от количества клеток и содержания пигментов в суспензии.

**2.3.2. Индукционные кривые флуоресценции отдельных клеток** определяли с помощью импульсного микрофлуориметра с высокой частотой повторения световых импульсов (fast repetition rate), описанного ранее [Kuznetsov et al., 2021]. Длительность световых импульсов составляла 4 мкс, частота следования — 100 кГц, ППФ —  $25\,000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  ( $\lambda = 455 \text{ нм}$ ). В каждом образце анализировали 50 адаптированных к темноте клеток. Для увеличения соотношения «сигнал/шум» применяли технику усреднения, когда для одной клетки регистрировали серию из десяти индукционных кривых. Темновая адаптация между измерениями параметров флуоресценции каждой клетки составляла 20 с. В целях экономии времени, для сокращения времени темновой адаптации между последовательными измерениями, определяли только  $OJ$ -фазу (0–1 мс) флуоресценции. Благодаря высокой ППФ за это время большинство РЦ переходит в закрытое состояние. Для каждой клетки получали начальное значение флуоресценции  $F_o$  и значение максимума флуоресценции в состоянии однократно сработавшего РЦ (одного оборота),



Таблица 1. Параметры и расчетные индексы ЛР-теста анализа кинетики флуоресценции хлорофилла *a* [Strasser, Strasser, 1995; Strasser, Tsimilli-Michael, Srivastava, 2004]

Параметр флуоресценции	Описание
$F_o, F_J, F_I, F_m$	Интенсивности флуоресценции при 0,05 (уровень <i>O</i> ), 2 (пик <i>J</i> ), 30 (пик <i>I</i> ) мс и максимальная флуоресценция во время пика <i>P</i>
$V_J = \frac{F_J - F_o}{F_v}$	Относительная переменная флуоресценция пика <i>J</i>
$V_I = \frac{F_I - F_o}{F_v}$	Относительная переменная флуоресценция пика <i>I</i>
$\Delta J = V_{J(\text{токсикант})} - V_{J(\text{контроль})}$	Разность значений функций $V_J$ контроля и токсиканта
$\Delta I = V_{I(\text{токсикант})} - V_{I(\text{контроль})}$	Разность значений функций $V_I$ контроля и токсиканта
$M_0 = 4 \frac{F_{300 \text{ мкс}} - F_o}{F_v}$	Начальный наклон (в $\text{мс}^{-1}$ ) дважды нормированной кривой индукции флуоресценции $V_t = \frac{F_t - F_o}{F_m - F_o}$
$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$	Максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФСII
$\psi_{Eo} = 1 - V_J$	Вероятность того, что захваченный экситон перемещает электрон за пределы $Q_A^-$
$\varphi_{Eo} = \frac{F_v}{F_m} \cdot \psi_{Eo}$	Квантовый выход электронного транспорта
$\delta_{Ro} = \frac{1 - V_I}{1 - V_J}$	Вероятность, с которой электрон от межсистемных электронных переносчиков перемещается к конечным акцепторам в ФСI
$\varphi_{Ro} = \frac{F_v}{F_m} \cdot (1 - V_I)$	Квантовый выход восстановления конечных акцепторов в ФСI
$\varphi_{Do} = 1 - \frac{F_v}{F_m}$	Квантовая эффективность рассеивания энергии в виде тепла
$\frac{ABS}{RC} = M_0 \cdot \left( V_J \cdot \frac{F_v}{F_m} \right)^{-1}$	Поглощаемый поток энергии на РЦ
$\frac{DI_0}{RC} = M_0 \cdot \left( 1 - \frac{F_v}{F_m} \right) \cdot \left( V_J - \frac{F_v}{F_m} \right)^{-1}$	Рассеиваемый поток энергии на РЦ
$PI_{ABS} = \left( \frac{ABS}{RC} \right)^{-1} \cdot \frac{F_v}{F_m} \cdot \left( 1 - \frac{F_v}{F_m} \right)^{-1} \cdot \psi_{Eo} \cdot (1 - \psi_{Eo})^{-1}$	Показатель функциональной активности ФСII, отнесенной к поглощаемой энергии (индекс производительности ФСII)

которое обозначали как  $F_{st}$ . Фотохимический квантовый выход ФСII определяли следующим образом:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_{st} - F_o}{F_{st}} = \frac{\Delta F}{F_{st}}$$

#### 2.4. Математическая обработка данных

Расчет ядерной оценки плотности распределения проводили с помощью пакета KDEру [Odland, 2023]. Учитывая, что рассматриваемые параметры имеют область определения  $\mathbb{R}_+$ , то есть действительные положительные числа, при расчете ядерной оценки плотности распределения исходные данные дублировали с отрицательным знаком, а полученные оценки плотности в отрицательной области устанавливали равными нулю. Для стандартизации и преобразования данных методом главных компонент был применен пакет SciPy [Virtanen et al., 2020]. Спектральную мультиэкспоненциальную аппроксимацию индукционных кривых проводили с помощью

разработанного авторами пакета `pyPhotoSyn` [Плюснина и др., 2015; Plyusnina et al., 2020]. Расчет LASSO-регрессии по методу наименьших углов проведен с помощью пакета `SciPy` [Virtanen et al., 2020].

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программе `Statistica` (StatSoft, Inc. STATISTICA (Data Analysis Software System), версия 13.3.704.19, 2025. <http://www.statsoft.com>). Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок исследуемых параметров. Принимая во внимание малый объем выборок, статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим `post-hoc`-тестом Данна для попарного сравнения выборок, считая различия между выборками статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Влияние ионов меди на содержание хлорофилла *a* и каротиноидов

Эксперимент по действию ионов меди был поставлен в двух вариантах — в темноте и при постоянном освещении. Известно, что в некоторых случаях свет усиливает повреждающее действие стрессовых факторов на фотосинтетический аппарат водорослей, однако при постоянном освещении клетки сохраняют активный метаболизм, что делает такие условия более физиологичными для эксперимента.

На рис. 1 представлены данные по влиянию  $\text{CuSO}_4$  в конечных концентрациях 0,1–10 мкМ на содержание хлорофилла *a* (рис. 1, *a*, *б*) и каротиноидов (рис. 1, *в*, *г*) в клетках *S. quadricauda* в условиях световой (рис. 1, *a*, *в*) и темновой (рис. 1, *б*, *г*) инкубации. Как видно из рисунка, в контрольных условиях за 24 часа увеличение содержания хлорофилла *a* не происходило. Оптическая плотность в контроле и в образцах с содержанием ионов меди 0,1 и 1 мкМ сохранялась на уровне 0,04, который был задан при начальном разведении маточной культуры во время ее пересадки в экспериментальные пробирки. Действие ионов меди в концентрации 10 мкМ в условиях световой инкубации сопровождалось уменьшением оптической плотности по сравнению с контролем: на четверть через первые 2 часа и почти вдвое через сутки (рис. 1, *a*). Поглощение каротиноидов также слабо изменялось в контроле и при концентрациях ионов меди 0,1 и 1 мкМ в течение всего периода инкубации, но уменьшалось к 24 ч при действии ионов меди в концентрации 10 мкМ (рис. 1, *в*, *г*).

Таким образом, только при относительно высокой концентрации ионов меди (10 мкМ) наблюдается постепенное разрушение хлорофилла *a* и каротиноидов.

#### 3.2. Влияние ионов меди на кинетику численности клеток *S. quadricauda* в популяции

Большое значение при мониторинге и оценке токсичности различных токсикантов имеет исследование влияния этих токсикантов на способность увеличения численности клеток в популяции. Проведен анализ влияния  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1–10 мкМ на динамику роста клеток *S. quadricauda* в суспензии в сравнении с контрольными условиями (рис. 2). Из рис. 2 видно, что достоверное снижение количества клеток по сравнению с контролем наблюдалось на 4-е сутки инкубации при максимальной концентрации ионов меди (10 мкМ), на 6-е сутки — при средней концентрации (1 мкМ) и на 7-е сутки при минимальной концентрации (0,1 мкМ). Описанный выше метод регистрации поглощения хлорофилла *a* и каротиноидов оказался более чувствительным для выявления токсичности ионов меди, по крайней мере при максимальной их концентрации (10 мкМ), поскольку выявлял изменения уже после 2 часов инкубации (рис. 1).

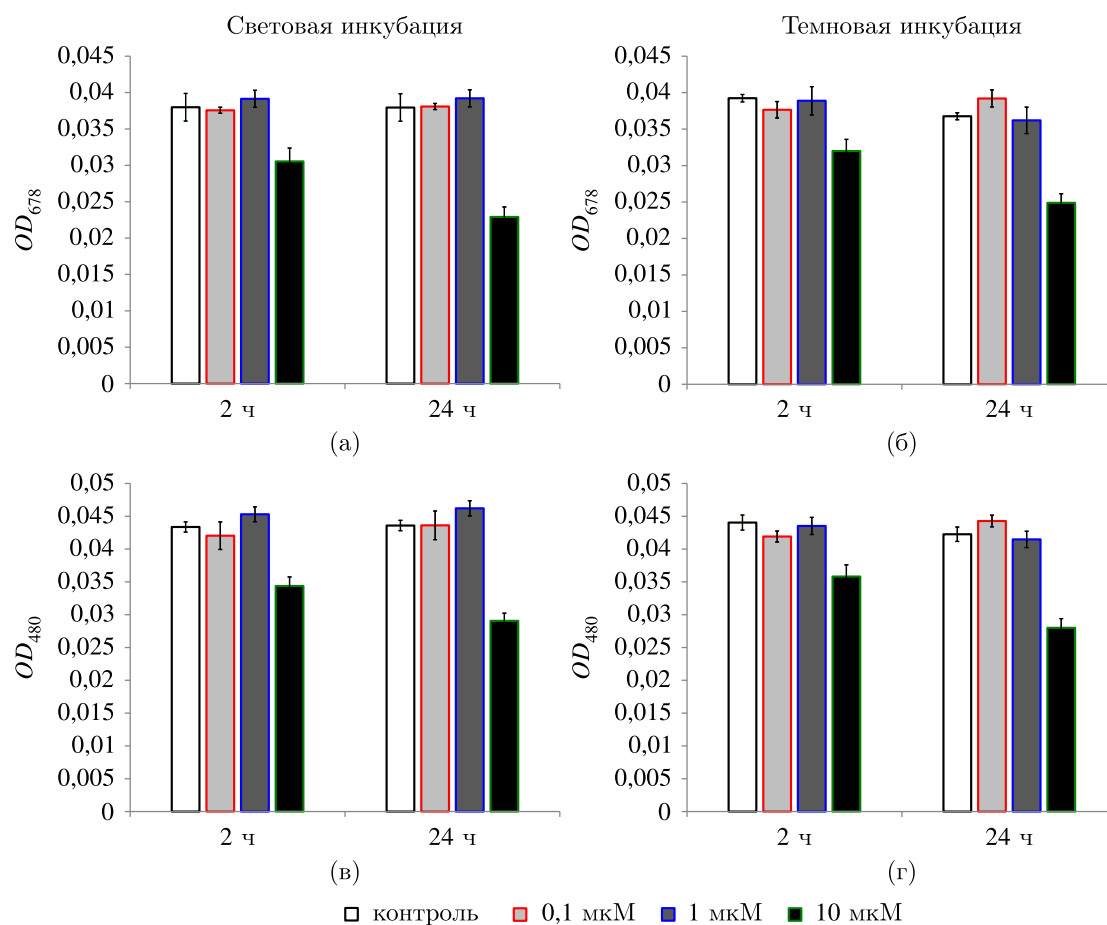


Рис. 1. Изменение оптической плотности в полосе поглощения хлорофилла  $a$  —  $\lambda_{\text{max}} = 678$  нм (а, б) и каротиноидов —  $\lambda_{\text{max}} = 480$  нм (в, г) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10  $\mu\text{M}$ . Инкубация клеток до начала измерения проводилась в течение 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а, в) и в темновых условиях (б, г)

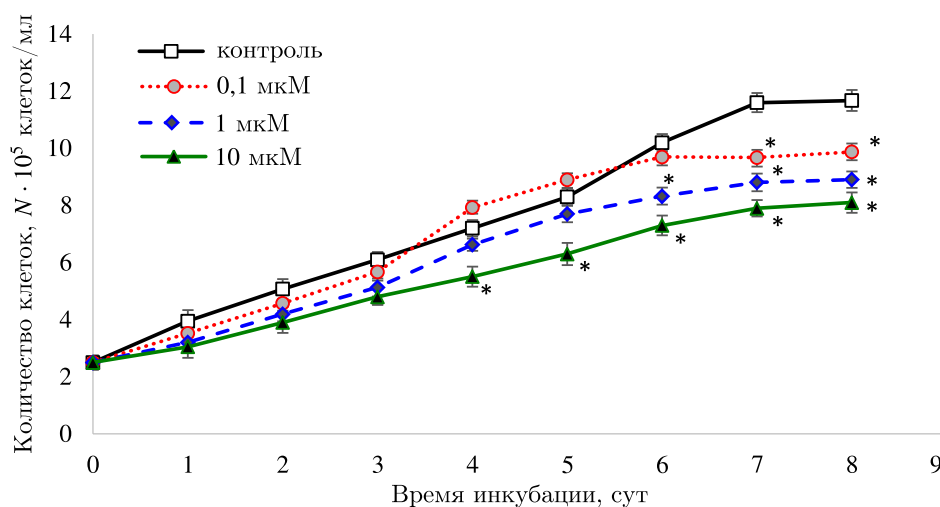


Рис. 2. Изменение количество клеток в суспензии культуры микроводоросли *S. quadricauda* при росте культуры в контроле и при добавлении  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10  $\mu\text{M}$  при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и температуре  $23^\circ\text{C}$ . \* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$

### 3.3. Влияние ионов меди на интенсивность флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в суспензии клеток при их инкубации в световых и темновых условиях

Влияние ионов меди на первичные реакции фотосинтеза в суспензии клеток *S. quadricauda* было исследовано путем анализа изменения параметра  $\frac{F_v}{F_m}$  — фотохимического квантового выхода ФСII. Параметр  $\frac{F_v}{F_m}$  широко используется для оценки эффективности фотохимических процессов в ФСII при исследовании токсичности агентов, воздействующих на фотосинтезирующие организмы [Маторин, Рубин, 2012]. На рис. 3 представлено влияние ионов меди на  $\frac{F_v}{F_m}$  суспензии клеток *S. quadricauda* после 2 ч и 24 ч инкубации в световых и темновых условиях. Статистически значимых различий между действием ионов меди в различных концентрациях с помощью традиционной оценки параметра  $\frac{F_v}{F_m}$  выявить не удалось.

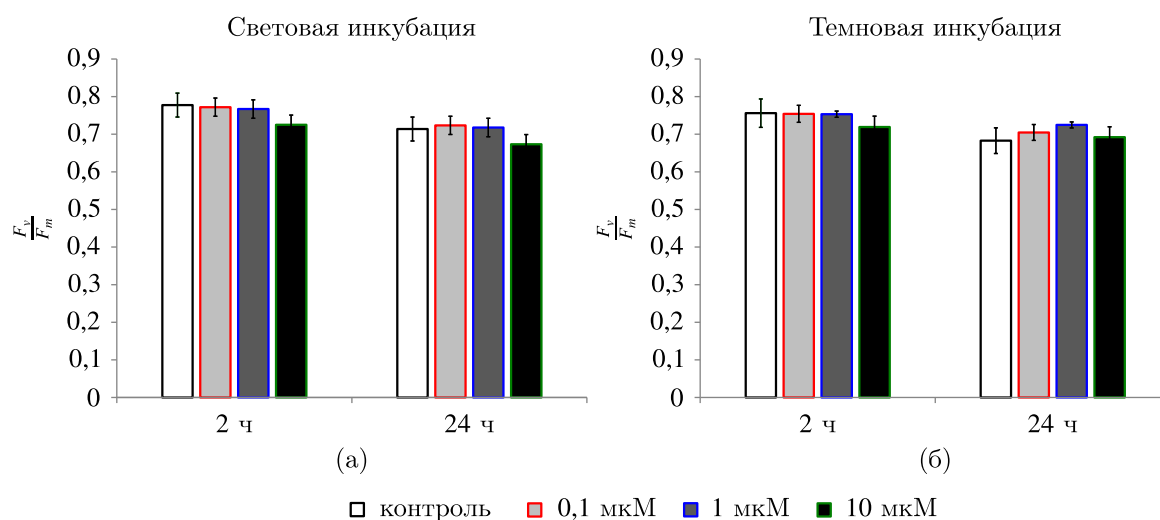


Рис. 3. Изменение  $\frac{F_v}{F_m}$  культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  при концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а) и в темновых условиях (б)

Для увеличения чувствительности оценок мы исследовали, как изменяются значения минимальной ( $F_o$ ) и максимальной ( $F_m$ ) флуоресценции по отдельности. Чтобы исключить зависимость  $F_o$  и  $F_m$  от концентрации пигментов, рассчитывались удельные параметры  $F_o^*$  и  $F_m^*$ : исходные значения  $F_o$  и  $F_m$  делили на оптическую плотность суспензии при длине волны возбуждения флуоресценции 455 нм. Это позволило отслеживать влияние ионов меди отдельно на фотохимическое тушение и на нефотохимическое тушение возбужденных состояний хлорофилла *a*. Удельные значения интенсивности минимальной ( $F_o^*$ ) и максимальной ( $F_m^*$ ) флуоресценции в контроле с течением времени изменялось несущественно (рис. 4), статистически достоверных различий не обнаружено ни для световых, ни для темновых условий инкубации.

В концентрациях 0,1 и 1 мкМ для обоих условий культивирования ионы меди не оказывали какого-либо действия даже при 24 ч инкубации, различий в значениях показателей  $F_o^*$  и  $F_m^*$  по сравнению с контролем выявлено не было (рис. 4). При более высокой концентрации, 10 мкМ, после 24 ч инкубации ионы меди вызывали значимое уменьшение  $F_o^*$  и  $F_m^*$  как в световых, так и в темновых условиях. Это свидетельствует о выраженном нефотохимическом тушении возбужденных молекул хлорофилла *a*, что приводит к рассеиванию избыточной энергии и предотвращает образование активных форм кислорода.

Несмотря на то что статистически значимых различий действия ионов меди в концентрации 0,1 мкМ, по сравнению с контролем, не обнаружено, из рис. 4 видна тенденция к увеличе-

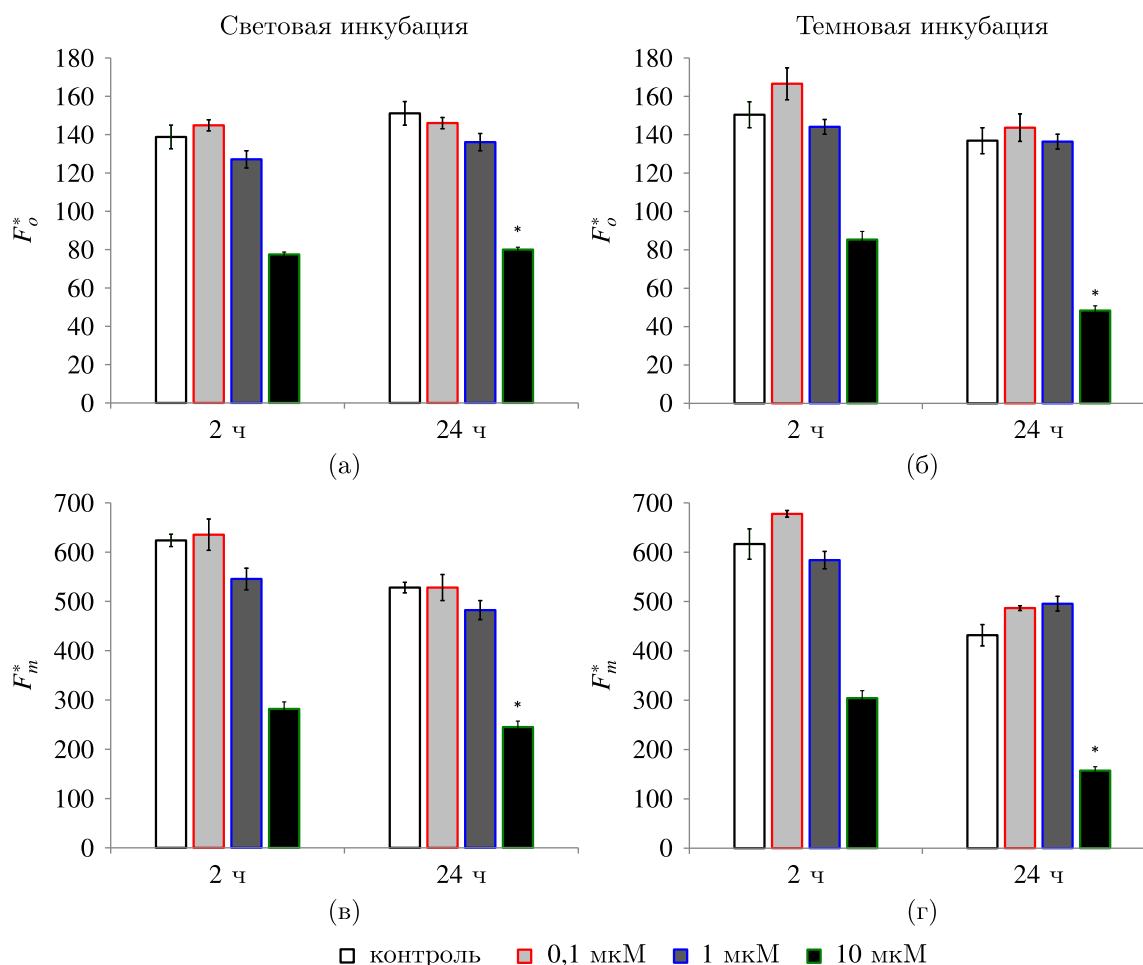


Рис. 4. Изменение удельных (нормированных на  $OD_{455}$ ) значений минимальной —  $F_o^*$  (а, б) и максимальной —  $F_m^*$  флуоресценции хлорофилла  $a$  (в, г) (в расчете на единицу поглощенной световой энергии) культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $CuSO_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 2 и 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ 50 мкмоль  $\cdot$  м<sup>-2</sup>  $\cdot$  с<sup>-1</sup> (а, в) и в темновых условиях (б, г). \* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$

нию показателей  $F_o^*$  и  $F_m^*$ . Статистический анализ показывает, что через 2 ч световой инкубации обнаруживаются значимые различия между действием ионов меди в концентрации 0,1 мкМ и 10 мкМ ( $p = 0,03$  для  $F_o^*$ ,  $p = 0,04$  для  $F_m^*$ ). Как указывалось выше, в отдельных случаях ионы меди в низких концентрациях могут оказывать некоторое стимулирующее влияние на клетки [Dauda, Lombardi, 2023; Xu et al., 2021]. Представленные на рис. 4 результаты, по всей видимости, демонстрируют именно такой эффект. Стимуляция может быть связана с тем, что ионы меди необходимы для синтеза белка пластоцианина, который, наряду с цитохромом  $c_6$ , является одним из переносчиков электронов между цитохромным  $b_6f$ -комплексом и ФСII у зеленых микроводорослей. Интересно, что различия между действием ионов в концентрациях 0,1 мкМ и 10 мкМ проявляются через 2 часа культивирования и исчезают через 24 ч, это может указывать на то, что эффект действия низких концентраций ионов меди (токсический или, наоборот, стимулирующий) может зависеть не только от конкретной концентрации условного токсиканта, но и от длительности его действия.

Таким образом, подход, основанный на анализе удельных значений параметров  $F_o^*$  и  $F_m^*$ , полученных при нормировании  $F_o$  и  $F_m$  на единицу поглощенной световой энергии в клеточных

суспензиях, позволяет выявлять изменения в работе фотосинтетического аппарата под действием  $\text{CuSO}_4$ , которые могут не регистрироваться при стандартной оценке фотохимической эффективности ФСII по параметру  $\frac{F_v}{F_m}$  (рис. 3). Наблюдаемые изменения  $F_o^*$  и  $F_m^*$  могут быть связаны как с нефотохимическим тушением, так и с другими процессами, включая структурные модификации светособирающих комплексов или повреждение РЦ ФСII.

### 3.4. Влияние ионов меди на интенсивность флуоресценции открытых и закрытых РЦ ФСII в одиночных клетках в условиях световой и темновой инкубации

В дополнение к измерениям флуоресценции на суспензиях клеток мы провели измерения флуоресценции на уровне одиночных клеток. Известно, что клетки в популяции сильно отличаются друг от друга по размеру, по содержанию фотосинтетических пигментов и по характеристикам первичных процессов фотосинтеза [Kuznetsov et al., 2021; Riznichenko et al., 1996]. В более ранних работах по токсическому действию ионов меди отмечено интенсивное тушение флуоресценции хлорофилла *a* [Mallick, Mohn, 2003]. Это подтверждается и нашими данными, полученными на суспензиях клеток (рис. 4, снижение  $F_o^*$  и  $F_m^*$  при концентрации ионов меди 10 мкМ).

Клетки, наиболее чувствительные к  $\text{CuSO}_4$ , демонстрируют резкое подавление флуоресценции и практически «исчезают» в усредненном сигнале популяции. Для выявления таких клеток и изучения их физиологического состояния были проведены измерения на одиночных клетках (рис. 5).

На диаграммах (рис. 5, *a, б*) каждой точке соответствует одна клетка. Клетки в популяции значительно отличаются друг от друга по размеру и по содержанию хлорофилла *a*, поэтому интенсивность минимальной ( $F_o$ ) и максимальной ( $F_{st}$ ) флуоресценции менялась в 2,5–3 раза даже в контрольной группе (рис. 5, *a*). Отметим, что параметры  $F_o$  и  $F_{st}$  сильно коррелируют между собой (коэффициент корреляции 0,98). Для оценки вариативности интенсивности построены графики ядерной оценки плотности распределения  $F_{st}$  (рис. 5, *в, г*). При инкубации в световых условиях у клеток наблюдалась большая вариативность параметров  $F_o$  и  $F_{st}$ , в особенности у клеток при действии ионов меди в наименьшей концентрации (0,1 мкМ).

Проведен анализ массива данных  $F_o$  и  $F_{st}$  с помощью метода главных компонент. При преобразовании массива данных его начальная размерность осталась равной двум, поэтому проведенная трансформация не вызвала утраты информации, а лишь изменила ориентацию и масштаб осей на графиках (рис. 6). Направление оси  $PCA0$  соответствует максимальной дисперсии исходных данных (после стандартизации), оси  $PCA1$  — ортогонально ей. Преобразование координат может быть представлено формулой

$$PCA0 = 6,42 \cdot 10^{-4} \cdot F_o + 3,61 \cdot 10^{-4} \cdot F_{st} - 1,964,$$

$$PCA1 = 6,42 \cdot 10^{-4} \cdot F_o - 3,61 \cdot 10^{-4} \cdot F_{st} + 0,007.$$

Одинаковые коэффициенты при параметрах  $F_o$  и  $F_{st}$  связаны с сильной корреляцией этих параметров между собой. Поскольку в данном случае максимальная дисперсия связана с изменением интенсивности флуоресценции отдельных клеток, полученные с помощью метода главных компонент производные параметры  $PCA0$  и  $PCA1$  имеют вполне понятный биологический смысл. Величина  $PCA0$  характеризует интенсивность флуоресценции отдельных клеток, а ортогональная ей величина  $PCA1$  связана с изменением фотохимической активности клеток. Однако использование линейного преобразования не позволяет полностью разделить влияние интенсивности флуоресценции и фотохимической активности, поэтому более наглядно разницу между клетками можно увидеть в координатах  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  и  $F_{st}$  (рис. 5, *б, д, e*), где  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  характеризует фотохимическую активность клеток. Отметим, что при небольших значениях  $F_{st}$  аппаратные шумы



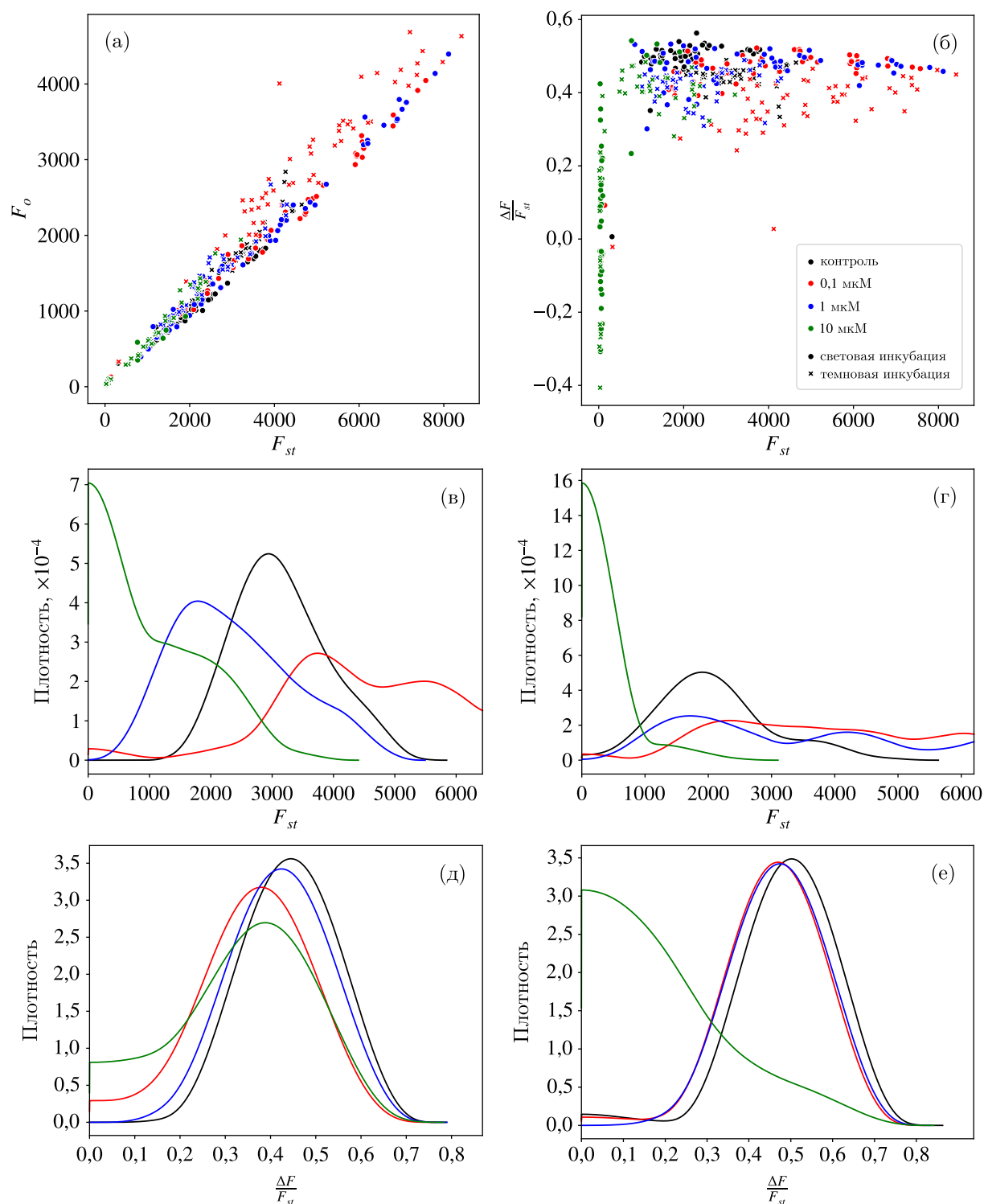


Рис. 5. Результаты измерения максимальной ( $F_{st}$ ) и минимальной ( $F_o$ ) флуоресценции клетки в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и в темновых условиях. Диаграммы рассеяния: для параметров  $F_{st}$  и  $F_o$  (а); для параметров  $F_{st}$  и  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  (б). Ядерная оценка плотности распределения  $F_{st}$  (в, г) и  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  (д, е) при инкубации на свету (в, д) и в темноте (г, е)

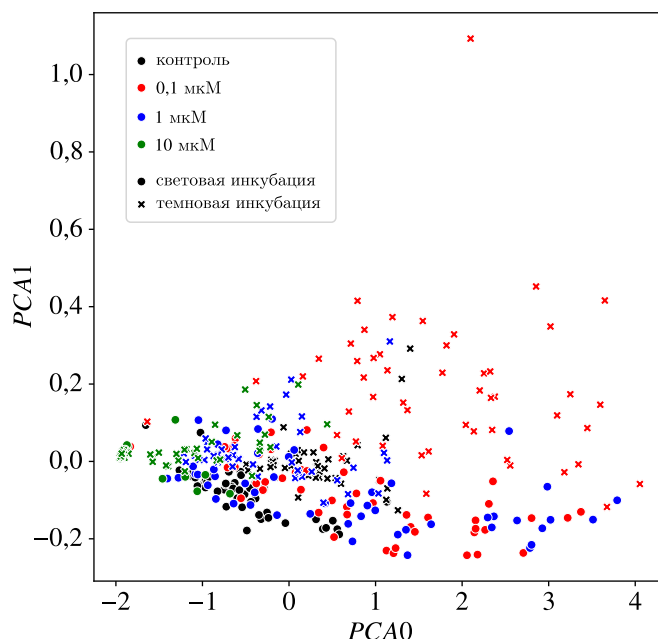


Рис. 6. Диаграмма рассеяния для полученных с помощью метода главных компонент параметров  $PCA0$  и  $PCA1$  одиночных клеток микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $CuSO_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и в темновых условиях

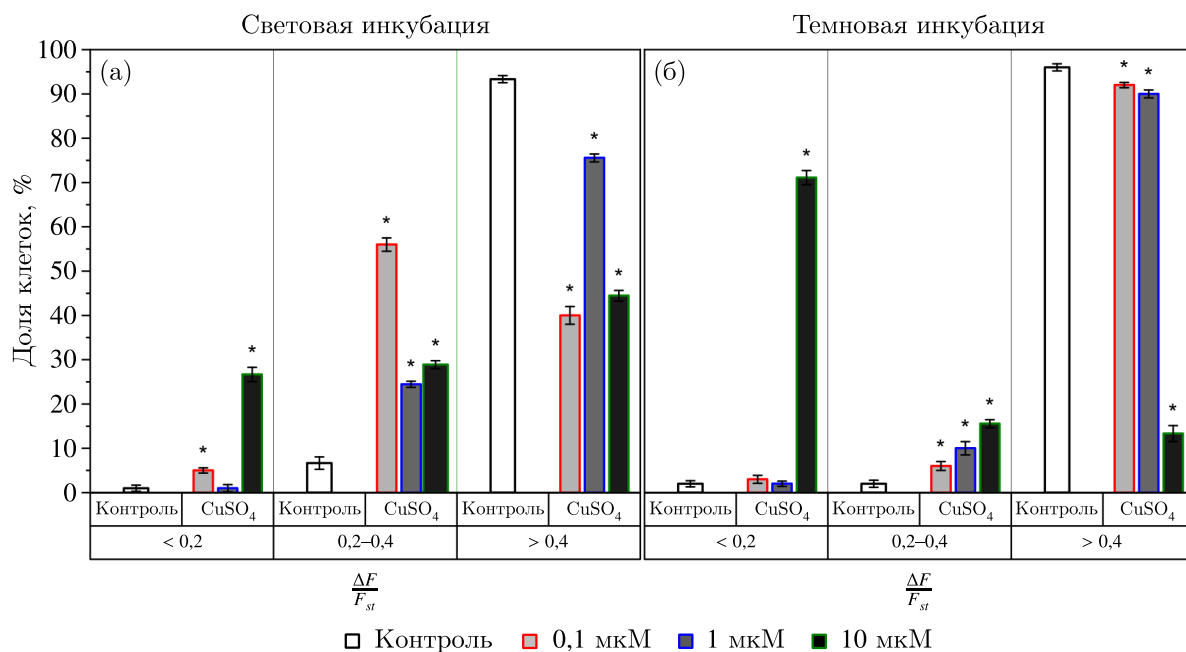


Рис. 7. Гистограммы распределения одиночных клеток по фотохимической активности ФСП в популяции клеток культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $CuSO_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а) и в темновых условиях (б). \* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$

приводят к увеличению наблюдаемого разброса  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  и даже появлению отрицательных значений  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$ .

На рис. 7 результаты измерений фотохимической активности ФСII на одиночных клетках представлены в виде гистограмм распределения соотношения  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$ . Весь диапазон измеренных значений  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  разбит на три области: область низких (0–0,2), средних (0,2–0,4) и высоких (>0,4) значений. На рис. 7 представлены данные, показывающие процент клеток в каждой области. В контрольных условиях более 90% клеток находились в категории высокой активности. С увеличением концентрации  $\text{CuSO}_4$  распределение клеток смещалось в сторону «средней» и «низкой» категории. В случае действия ионов меди более выраженный эффект наблюдался при темновой инкубации (рис. 7, б). Даже при гибели значительной части клеток при действии ионов меди в максимальной концентрации (10 мкМ) в популяции оставались клетки с высоким значением  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$ . При световых условиях инкубации количество клеток, имеющих показатель  $\frac{\Delta F}{F_{st}}$  в области высоких значений (>0,4), гораздо выше, чем при темновой инкубации (рис. 7, б). Обнаруженная с помощью микрофлуориметрического анализа одиночных клеток неоднородность реакции клеток на  $\text{CuSO}_4$  может иметь важное экологическое значение, обеспечивая выживание части популяции в стрессовых условиях.

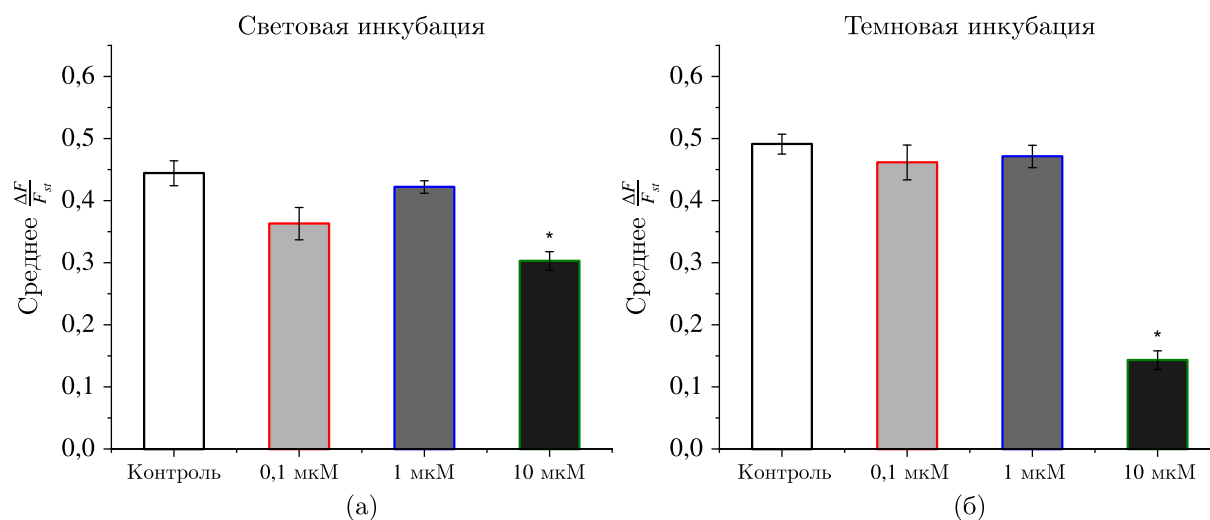


Рис. 8. Значения среднего по клеткам фотохимического квантового выхода ФСII культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а) и в темновых условиях (б). \* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$

Мы оценили средние значения фотохимического квантового выхода ФСII  $\left(\frac{\Delta F}{F_{st}}\right)$  для популяции клеток при действии различных концентраций ионов меди (рис. 8). Видно, что при действии ионов меди в наибольшей концентрации (10 мкМ) наблюдалось значительное снижение данного параметра, причем эффект более выражен при темновой инкубации (рис. 8, б). Таким образом, определение показателя относительной переменной флуоресценции на одиночных клетках является более информативным методом при выявлении токсического действия ионов меди, чем стандартные измерения в кювете (рис. 3). По данным микрофлуориметрического анализа одиночных клеток нами рассчитаны средние на клетку значения  $F_o$  и  $F_{st}$  (рис. 9).

На рис. 9 видно, что средние значения  $F_o$  и  $F_{st}$  изменяются немонотонно в зависимости от концентрации ионов меди. При концентрации 0,1 мкМ наблюдается повышение уровней  $F_o$  и  $F_{st}$ , тогда как при максимальной концентрации (10 мкМ) происходит существенное снижение этих параметров как для темновых, так и для световых условий. При этом эффект больших

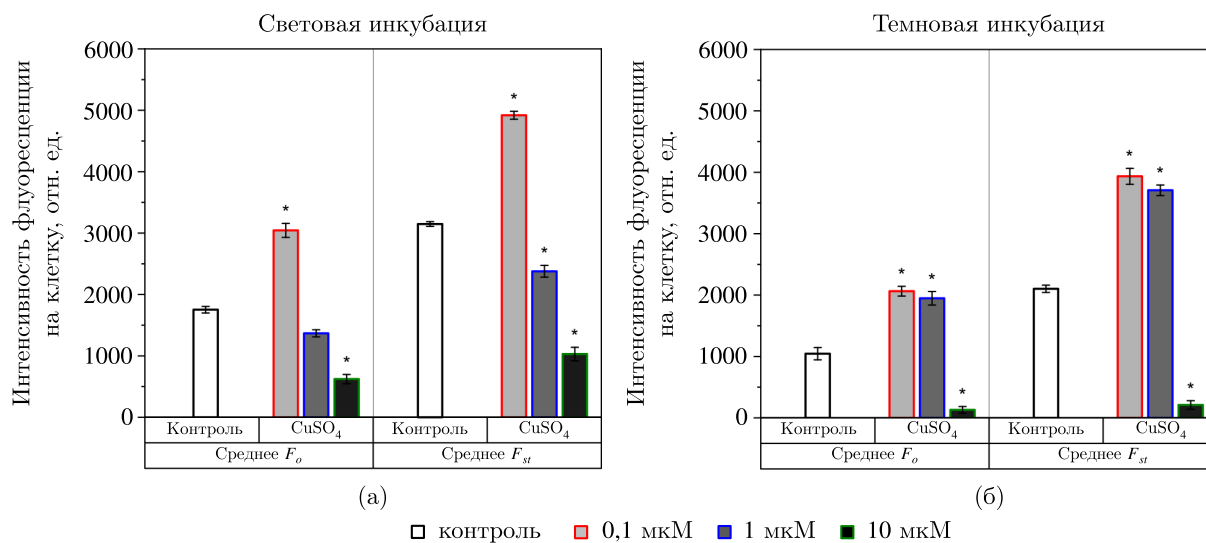


Рис. 9. Средние значения минимальной ( $F_o$ ) и максимальной ( $F_{st}$ ) флуоресценции на одну клетку культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10  $\mu\text{M}$  в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а) и в темновых условиях (б). \* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$

концентраций более выражен для темновых условий инкубации (рис. 9, б). При средних же концентрациях (1  $\mu\text{M}$ ) в световых условиях наблюдалось незначительное снижение параметров (рис. 9, а), а в темновых условиях — достоверное увеличение этих параметров (рис. 9, б).

Полученные данные демонстрируют, что метод микрофлуориметрии, применяемый к одиночным клеткам, демонстрирует более высокую чувствительность выявления действия  $\text{CuSO}_4$  после 24 ч инкубации (рис. 9) по сравнению с измерениями на суспензиях клеток (рис. 4, 24 ч) и способен обнаруживать эффекты ионов меди даже в минимальных концентрациях.

### 3.5. Особенности действия ионов меди на индукцию быстрой флуоресценции хлорофилла *a* в культуре микроводоросли *S. quadricauda*: ОЛР-кривые

Как указывалось выше, анализ изменения формы кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* широко используется при выявлении действия различных факторов на фотосинтетический аппарат клетки. На рис. 10 представлены индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* микроводоросли *S. quadricauda* после воздействия ионов меди в концентрациях 0,1, 1 и 10  $\mu\text{M}$  после 24 ч инкубации в темновых и световых условиях. После инкубации культуры с ионами меди выявлены изменения в форме ОЛР-кривых. Так, в присутствии наибольшей концентрации 10  $\mu\text{M}$  ионов меди обнаружено уменьшение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем как в световых, так и в темновых условиях инкубации (рис. 10, а, б). При воздействии средней концентрации 1  $\mu\text{M}$  и самой низкой концентрации 0,1  $\mu\text{M}$  в световых условиях инкубации не выявлено изменений в форме кривой по сравнению с контролем, тогда как в темновых условиях эти концентрации вызывали изменения в форме кривых по сравнению с контролем.

Изменения в отдельных фазах индукционных кривых выявлены после нормирования на начальный уровень флуоресценции, а также на переменную флуоресценцию ОЛР-кривых (рис. 10, в–е). Так, при воздействии ионов меди в высокой концентрации выявлено снижение уровней флуоресценции  $J$ ,  $I$  и  $P$  по сравнению с контролем. Снижение амплитуды  $J$ - $I$ - $P$  отражает относительное увеличение доли РЦ ФСII, которые не способны передавать электрон последующим переносчикам фотосинтетической ЭТЦ. Это может быть следствием как ингибирования

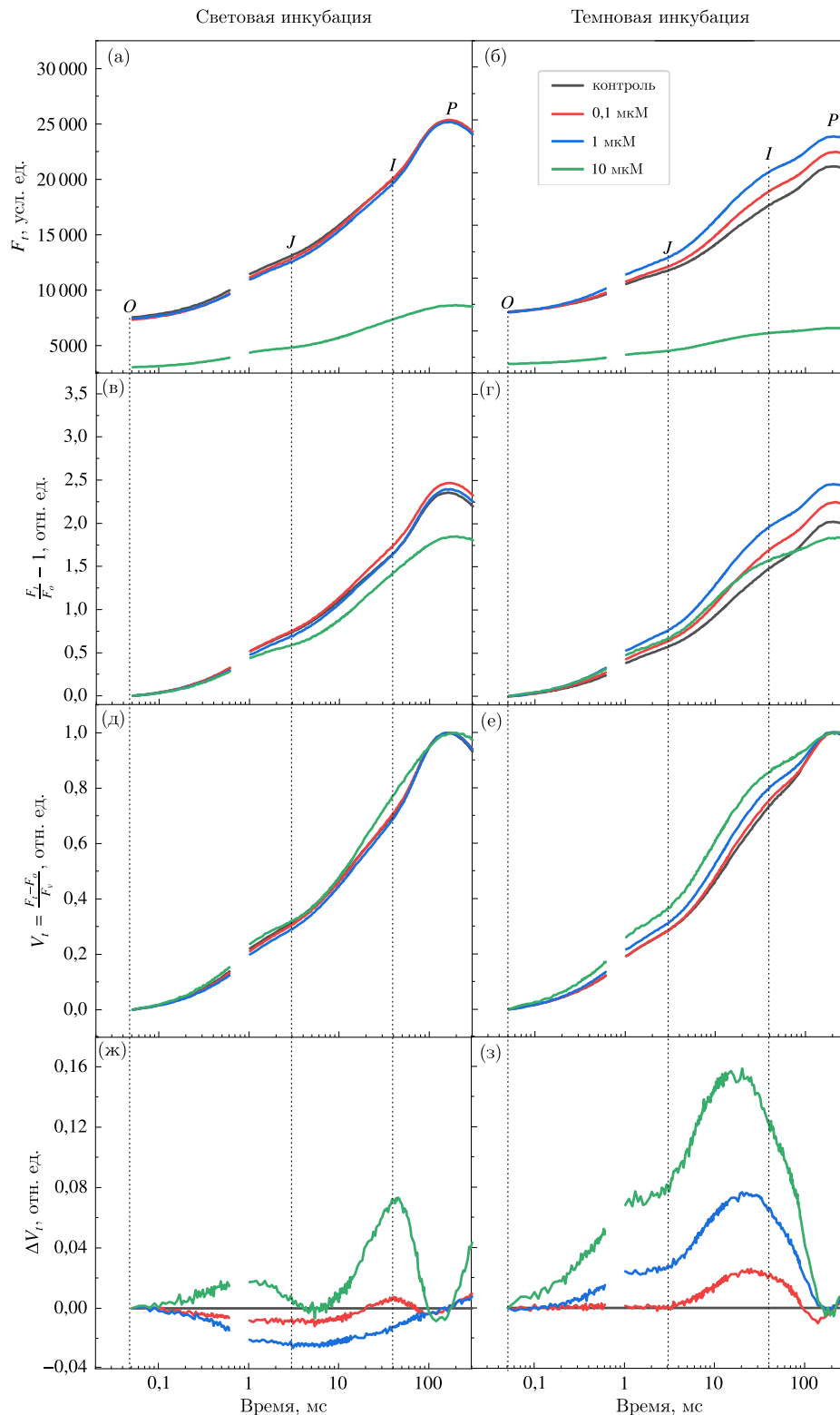


Рис. 10. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* (ОЖР-кривые) микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а) и в темновых условиях (б). ОЖР-кривые нормированы на начальную флуоресценцию при 20 мкс  $\frac{F_t}{F_o} - 1$  (в, г), переменную флуоресценцию  $V_t = \frac{F_t - F_o}{F_m - F_o}$  (д, е) и представлены в виде разности значений функций  $\Delta V_t = V_{t(\text{медь})} - V_{t(\text{контроль})}$  (ж, з). Точечными линиями обозначены стадии *O*, *J* и *I*

электронного транспорта на акцепторной стороне ФСЦ с накоплением восстановленного  $Q_A$ , так и следствием ингибирования на донорной стороне ФСЦ с накоплением  $P_{680}^+$ , который значительно тушит флуоресценцию хлорофилла  $a$  [Govindjee, 2004]. Снижение фазы  $J-I-P$  ранее наблюдали при воздействии ионов меди у других видов сценедесмуса *Scenedesmus obliquus* [Dewez et al., 2005], *Scenedesmus incrassatulus* [Perales-Vela et al., 2007] и хлореллы *Chlorella vulgaris* [Oukarroum, Perreault, Popovic, 2012].

Для устранения влияния начальных ( $F_o$ ) и максимальных ( $F_m$ ) уровней флуоресценции индукционные кривые были нормированы относительно этих значений и представлены в виде относительной переменной флуоресценции:  $V_t = \frac{F_t - F_o}{F_m - F_o}$  (рис. 10,  $\delta$ ,  $e$ ). Данное выражение принято в качестве меры доли  $Q_A$ , находящегося в восстановленном состоянии  $\left[ \frac{Q_A^-}{Q_{A(\text{total})}^-} \right]$ , и позволяет рассматривать динамику накопления  $Q_A^-$  в разных образцах [Haldimann, Strasser, 1999]. Значительные изменения в  $V_t$  после световой инкубации с ионами меди выявлены на уровне  $I$  ( $V_I$  при 30 мс), тогда как после темновой инкубации с ионами меди выявлен рост  $V_t$  не только на уровне  $I$ , но на уровне  $J$  ( $V_J$  при 2 мс). Увеличение  $V_J$  связано с нарушением электронного транспорта между  $Q_A$  и  $Q_B$  и, следовательно, накоплением  $Q_B^-$ -невосстанавливающих центров, не способных к реокислению  $Q_A^-$  и восстановлению пула хинонов.

Для улучшения визуализации изменений в  $V_t$  индукционные кривые представлены в виде разности значений функций  $\Delta V_t = V_{t(\text{медь})} - V_{t(\text{контроль})}$  [Kalaji et al., 2014] (рис. 10,  $\text{ж}$ ,  $з$ ). Как видно из рис. 10, после 24 ч инкубации с ионами меди обнаружено увеличение  $\Delta J$  при двух условиях инкубации, при этом наибольший рост  $\Delta J$  выявлен в темновых условиях для средней (1 мкМ) и максимальной (10 мкМ) концентраций. Наличие  $\Delta J$  связано с накоплением  $Q_A^-$ , т.е. со снижением скорости  $Q_A^-$ -реокисления [Kalaji et al., 2014]. При воздействии средней (1 мкМ) и высокой (10 мкМ) концентрации ионов меди отмечалось увеличение  $\Delta I$  после темновой инкубации, что отражает более быстрое восстановление пула  $PQ$  в связи со снижением скорости реокисления пластохинонов [Tsimilli-Michael, Strasser, 2008].

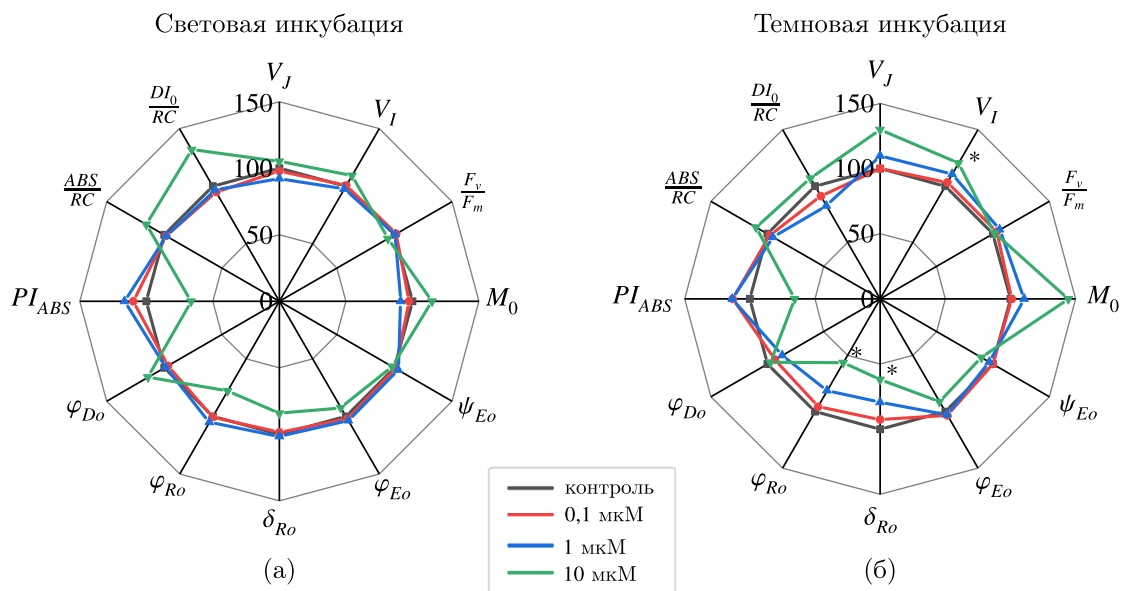


Рис. 11. Параметры флуоресценции JIP-теста, полученные из индукционной кривой флуоресценции хлорофилла  $a$  микроводоросли *S. quadricauda* в контроле и при инкубации с  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ в течение 24 ч при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а) и в темновых условиях (б). Параметры флуоресценции представлены в процентах от контроля. \* — достоверное отличие от контроля при  $p < 0,05$



На рис. 11 представлены параметры флуоресценции, полученные после анализа ОЛР-кривых. Начальный наклон относительной переменной флуоресценции ( $M_0$ ), измеренный между 50 и 300 мкс, увеличивался при воздействии высоких концентраций ионов меди, при этом достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) получены между максимальной и средней концентрациями в световых условиях. Увеличение  $M_0$  при воздействии высокой концентрации меди отражает увеличение эффективного сечения светособирающей антенны, приходящейся на активный РЦ ФСЦ ( $\frac{ABS}{RC}$ ), а также снижение энергетического взаимодействия между РЦ. Параметр  $\psi_{Eo}$  отражает вероятность транспорта электронов за пределы  $Q_A^-$ . При воздействии высокой концентрации ионов меди в темновых условиях выявлено снижение  $\psi_{Eo}$ , при этом значимые ( $p < 0,05$ ) отличия получены между максимальной (10 мкМ) и низкой (0,1 мкМ) концентрациями ионов меди в среде. Параметр  $\varphi_{Eo}$ , характеризующий квантовый выход электронного транспорта на акцепторной стороне ФСЦ, незначимо ( $p > 0,05$ ) снижался при световых и темновых условиях инкубации. В присутствии ионов меди выявлено снижение электронного транспорта на уровне пула PQ и далее к акцепторам ФСЦ ( $\delta_{Ro}$  и  $\varphi_{Ro}$ ). При этом значимые ( $p < 0,05$ ) изменения в параметрах  $\delta_{Ro}$  и  $\varphi_{Ro}$  выявлены для максимальной (10 мкМ) концентраций ионов меди по сравнению с контролем в темновых условиях. В случае со световыми условиями достоверные ( $p < 0,05$ ) отличия в параметре  $\delta_{Ro}$  получены между средней и максимальной концентрациями. Изменения в функциональной активности ФСЦ ( $PI_{ABS}$ ) и доле активных РЦ ( $\frac{ABS}{RC}$ ) выявлены при воздействии максимальной концентрации ионов меди в темновых условиях инкубации, при этом статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия получены между максимальной и средней концентрациями. Поскольку параметр  $PI_{ABS}$  рассчитывается на основе  $\frac{F_v}{F_m}$ ,  $\psi_{Eo}$  и  $\frac{ABS}{RC}$ , то во многом снижение данного параметра при воздействии максимальной концентрации меди в темновых условиях обусловлено значимым снижением  $\psi_{Eo}$  и  $\frac{ABS}{RC}$ . Также наблюдалось изменение параметров тепловой диссипации энергии, позволяющей снизить вероятность фотоокислительного повреждения РЦ ФСЦ. Это видно по изменению параметров квантовой эффективности диссипации поглощенной энергии ( $\varphi_{Do}$ ) и рассеяния поглощенной энергии в тепло на активный РЦ ( $\frac{DI_0}{RC}$ ). Так, достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) для данных параметров получены в темновых условиях между минимальной (0,1 мкМ) и средней (1 мкМ) концентрациями, а в случае со световыми условиями — для средней (1 мкМ) и максимальной (10 мкМ) концентраций.

На основании проведенного анализа выявлено, что наибольшие изменения в индукционных кривых отмечались при воздействии максимальной (10 мкМ) концентрации ионов меди. Большинство параметров ЛР-теста при данной концентрации достоверно отличались от минимальной (0,1 мкМ) и средней (10 мкМ) концентраций в сторону ингибирования. По-видимому, низкие и средние концентрации ионов меди в среде оказывают некоторое стимулирующее воздействие на ФСА через 24 ч инкубации, в связи с этим больше значимых отличий наблюдалось именно для данных концентраций. Наибольшую чувствительность к воздействию меди проявили параметры  $\delta_{Ro}$  и  $\varphi_{Ro}$  в темновых условиях, которые достоверно снижались не только при воздействии высокой (10 мкМ), но и средней (1 мкМ) концентрациями по сравнению с контролем.

### 3.6. Определение временных параметров индукционных кривых методом спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации

Для определения временных параметров индукционных кривых использовали метод спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации (рис. 12). В этом методе кривые индукции флуоресценции аппроксимируются с помощью суммы показательных функций

$$F(t) = F_0 + \sum_{i=1}^N a_i (1 - e^{-t/\tau_i}),$$

где  $a_i$  — множитель (амплитуда) при  $i$ -й показательной функции  $\tau_i$ . Характерные времена  $\tau_i$  задавали на логарифмической шкале с фиксированным шагом:  $\tau_i = 1,1 \cdot \tau_{i-1}$  [Плюснина и др., 2015; Plyusnina et al., 2020]. Для подбора множителей  $a_i$  использовали метод наименьших квадратов. При отсутствии ограничений на значения  $a_i$  такая аппроксимация позволяет получить настолько хорошее совпадение аппроксимированных кривых с экспериментальными данными, что в аппроксимированных кривых воспроизводятся даже аппаратные шумы флуориметра. Однако получаемые при такой аппроксимации значения  $a_i$  численно нестабильны: малейшее изменение экспериментальных данных приводит к изменению всех множителей  $a_i$ . Наборы множителей  $a_i$ , полученные в результате расчетов, характеризуются наличием больших положительных и отрицательных значений, следующих друг за другом в определенной последовательности; это связано с тем, что сумма двух соседних членов  $a_i(1 - e^{-t/\tau_i}) + a_{i+1}(1 - e^{-t/\tau_{i+1}})$  с одинаковыми по модулю, но разными по знаку множителями  $a_i$  и  $a_{i+1}$  имеет ненулевое значение при  $t \approx \tau_i$  и достаточно быстро приближается к нулю как при уменьшении, так и при увеличении  $t$ , в результате чего аппроксимация оказывается чувствительной к шумам в экспериментальных данных.

Для обеспечения устойчивости аппроксимации использовали ограничение  $a_i \geq 0$  [Плюснина и др., 2015], что позволило применить для аппроксимации метод NNLS [Lawson, Hanson, 1995; Bro, de Jong, 1997]. При такой аппроксимации большая часть множителей  $a_i$  принимает нулевые значения, а ненулевые коэффициенты объединяются в несколько групп. Выбор в качестве базиса функций вида  $1 - e^{-t/\tau_i}$  позволяет интерпретировать  $\tau_i$ , соответствующие ненулевым  $a_i$ , как характерные времена отдельных процессов приближения системы к стационарному состоянию; в таком случае сами величины  $a_i$  определяют вклад этих процессов в наблюдаемую динамику интенсивности флуоресценции. Характерные времена  $\tau_i$  заданы на фиксированной шкале, вследствие чего одному физическому процессу иногда соответствуют несколько смежных ненулевых множителей  $a_i$ . Чтобы правильно оценить вклад такого процесса в общую динамику, необходимо суммировать все относящиеся к нему множители  $a_i$ . В связи с этим получаемые наборы множителей  $a_i$  удобно визуализировать в виде ступенчатой кумулятивной суммы  $\sum_{j=1}^i a_j$ , которая соотносится с соответствующим характерным временем  $\tau_i$  (рис. 12, синяя ступенчатая линия). Вертикальные линии на графике соответствуют характерным временам процессов, а горизонтальные — той стационарной интенсивности флуоресценции, которая была бы достигнута при отсутствии процессов с большими характерными временами.

Отметим, что ограничение  $a_i \geq 0$  не имеет физического обоснования и не всегда приводит к хорошей аппроксимации экспериментальных данных. Чтобы улучшить аппроксимацию нарастающего участка индукционной кривой, мы отказались от ограничения  $a_i \geq 0$ , а для получения численно устойчивого результата использовали  $L_1$ -регуляризацию (LASSO) по методу наименьших углов (LARS) [Efron et al., 2004]. Аналогично методу NNLS этот метод приводит к занулению большей части коэффициентов  $a_i$ , однако в данном случае это достигается за счет требования того, чтобы  $L_1$ -норма  $(L_1 = \sum_i |a_i|)$  была не слишком большой. При решении оптимизационной задачи минимизируется величина  $\sum_j \text{err}_j^2 + \alpha \sum_i |a_i|$ , где  $\sum_j \text{err}_j^2$  — сумма квадратов регрессионных остатков,  $\alpha$  — коэффициент регуляризации. Однако при формальном применении  $L_1$ -регуляризации небольшое изменение коэффициента регуляризации может приводить к значительному перестроению структуры вектора множителей  $a_i$ : ненулевые значения устанавливаются равными нулю, а ненулевыми становятся другие компоненты вектора. Это связано с тем, что функция  $\sum_j \text{err}_j^2 + \alpha \sum_i |a_i|$  может иметь большое число сходных по глубине локальных минимумов. Избежать неустойчивости решения позволяет метод наименьших углов, представляющий собой разновидность пошаговой регрессии. В этом методе количество ненулевых  $a_i$  увеличи-

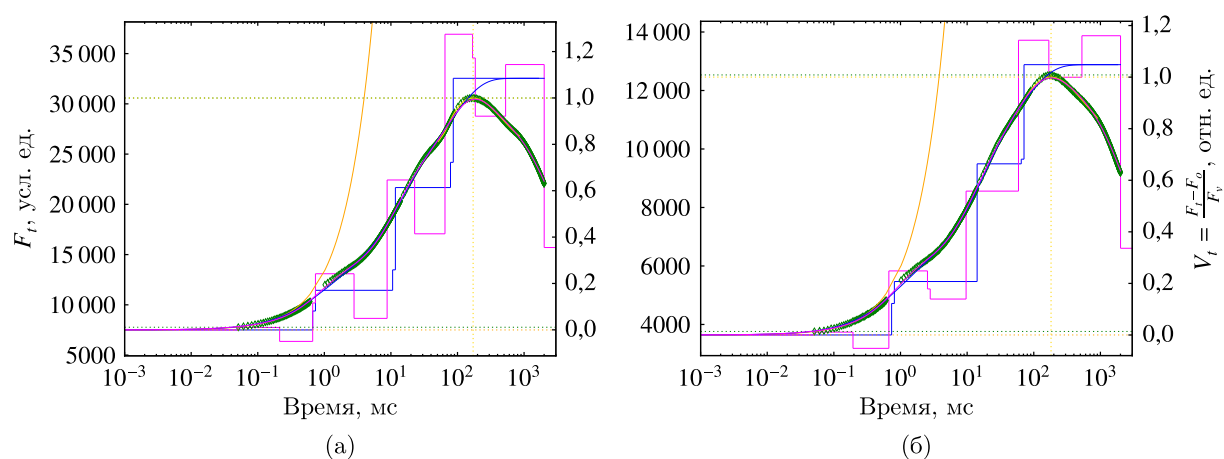


Рис. 12. Анализ кривых индукции флуоресценции культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях (а) и при действии ионов меди 10 мкМ (б). Инкубация клеток до начала измерения проводилась в течение 2 ч в темновых условиях. Зеленые ромбы — экспериментальные отсчеты. Оранжевая кривая — линейная аппроксимация начального участка индукционной кривой. Синяя кривая — спектральная мультиэкспоненциальная аппроксимация нарастающего участка индукционной кривой при ограничении  $a_i \geq 0$ . Малиновая кривая — спектральная мультиэкспоненциальная аппроксимация всей кривой с использованием LASSO-регрессии с коэффициентом регуляризации  $\alpha = 5 \cdot 10^{-6}$ . Синяя и малиновая ступенчатые линии — кумулятивные суммы предэкспоненциальных множителей для этих двух приближений. Точечные линии соответствуют оценкам величин  $F_o$  и  $F_m$

вается последовательно, с сохранением ранее выбранных компонент, что позволяет получить устойчивое решение. Показано, что использование коэффициента регуляризации  $\alpha$  в диапазоне от  $10^{-6}$  до  $10^{-5}$  позволяет получить хорошо совпадающее с экспериментальными данными разложение сигнала по базису, состоящему из экспоненциальных функций, при этом абсолютные величины коэффициентов  $a_i$  не более чем вдвое превышают величину переменной флуоресценции (см. файл с дополнительной информацией). На рис. 12 малиновыми кривыми показаны результаты такого разложения для двух экспериментальных кривых, зарегистрированных после 2 ч темновой инкубации суспензии *S. quadricauda* в контроле и при действии ионов меди 10 мкМ с коэффициентом регуляризации  $\alpha = 5 \cdot 10^{-6}$ , а малиновыми ступенчатыми линиями — соответствующие кумулятивные суммы. Можно видеть, что при  $L_1$ -регуляризации графики кумулятивных сумм состоят из чередующихся участков подъема и спада. Предложенный метод позволяет формализовать и автоматизировать оценку формы индукционных кривых. Отрицательный множитель с характерным временем около 200 мкс отражает то, что на начальных стадиях индукции флуоресценции рост ее интенсивности происходит медленнее, чем по экспоненте. Это может быть связано как с энергетическим связыванием между реакционными центрами ФСII, так и с накоплением катион-радикала  $P_{680}^+$ . Фазы индукции *OJ*, *Jl* и *IP* представлены двумя парами множителей противоположного знака, которые связаны с параметрами переноса электрона в акцепторной части ФСII, в цитохромном  $b_6f$ -комплексе и в ФСI соответственно. Еще одна пара множителей противоположного знака, относящихся к  $\tau_i$  более 500 мс, описывает спадающий участок индукционной кривой и может быть связана с такими медленными процессами, как активация ферредоксин-НАДФ-редуктазы и развитие нефотохимического тушения в РЦ ФСII. В настоящее время однозначная биологическая интерпретация смысла множителей  $a_i$  не представляется возможной, однако мы полагаем, что в будущем для выявления такого смысла может быть использован основанный на методах искусственного интеллекта совместный анализ параметров спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации кривых индукции флуоресценции и данных о редокс-состоянии участников фотосинтетической электрон-транспортной цепи при различных воздействиях.

На рис. 13 показаны графики кумулятивных сумм, рассчитанные с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации для усредненных по трем повторностям индукционных кривых, нормированных на максимальную переменную флуоресценцию (рис. 10, *d*, *e*). Характерные времена  $\tau_i$ , соответствующие ненулевым множителям  $a_i$ , в основном совпадают для всех кривых, однако действие ионов меди приводит к изменению самих амплитуд  $a_i$ . Наиболее явно видно исчезновение отрицательной амплитуды порядка 20 мс при действии максимальной (10 мкМ) концентрации ионов меди. Сопоставление этих данных с параметрами ЯР-теста позволяет предположить, что такое изменение может быть связано с изменением соотношения активностей ФСII и цитохромного  $b_6f$ -комплекса: снижение активности ФСII приводит к уменьшению скорости линейного электронного транспорта, в результате чего цитохромный  $b_6f$ -комплекс перестает лимитировать линейный электронный транспорт, что проявляется в соответствующем изменении формы индукционной кривой.

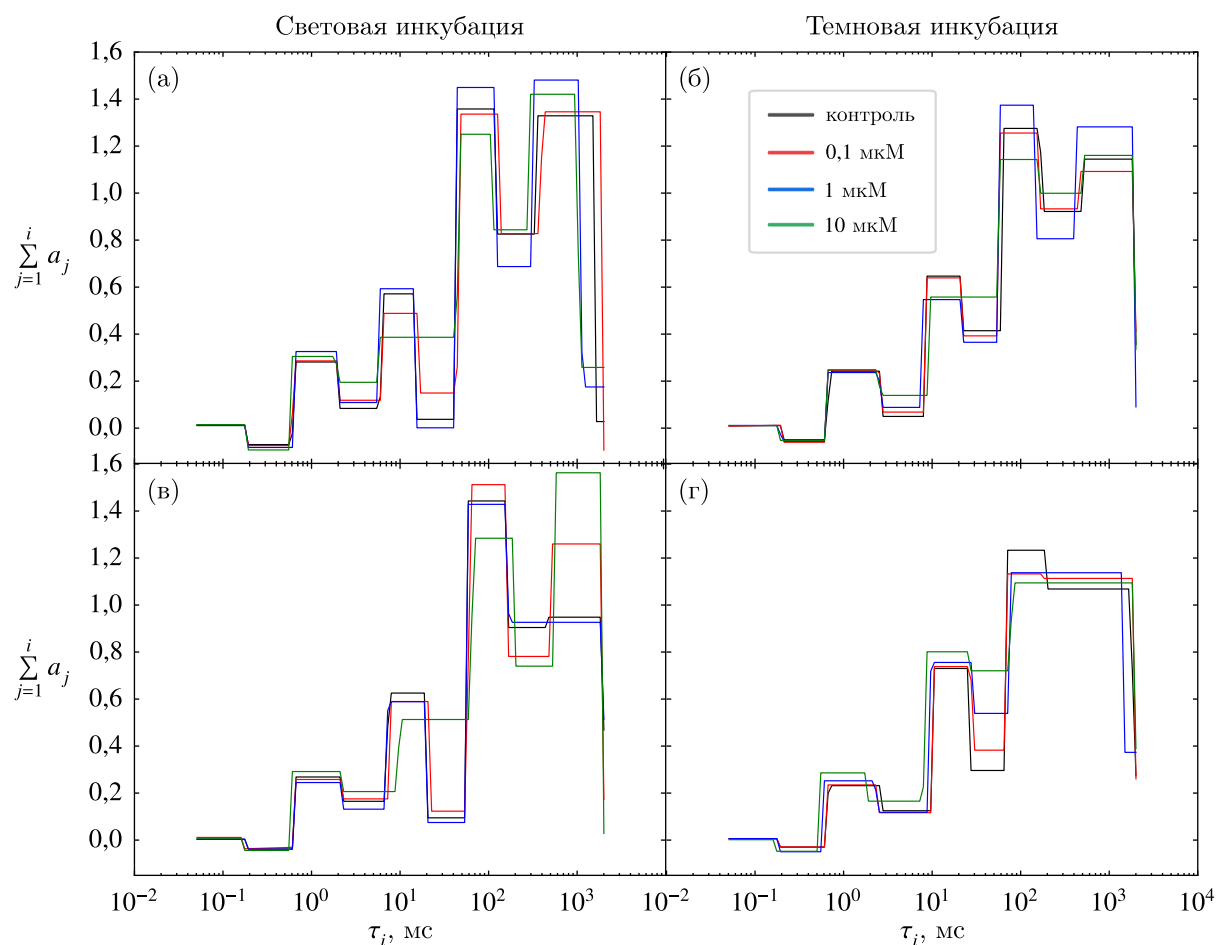


Рис. 13. Кумулятивные суммы коэффициентов спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации усредненных кривых индукции флуоресценции культуры микроводоросли *S. quadricauda* в контрольных условиях и при действии ионов меди. Инкубация клеток до начала измерения проводилась в течение 2 ч (а, б) и 24 ч (в, г) при непрерывном освещении светом ППФ  $50 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (а, в) и в темновых условиях (б, г)

#### 4. Заключение

С помощью комплекса биофизических методов исследовано влияние ионов меди на первичные процессы фотосинтеза пресноводной микроводоросли *S. quadricauda* с использованием

методов регистрации флуоресценции хлорофилла *a* как в суспензиях клеток, так и на уровне одиночных клеток. В работе показано, что ионы меди оказывают дозозависимое воздействие на фотосинтетический аппарат микроводорослей. При низких и средних концентрациях ионов меди (0,1 и 1 мкМ) наблюдалось незначительное влияние на исследуемые параметры, тогда как при высокой концентрации (10 мкМ) выявлены существенные изменения в работе ФСII.

В работе предложена новая модификация метода спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации, позволяющая формализовать описание формы индукционной кривой за счет представления ее в виде суммы показательных функций. Такое преобразование не только создает компактное представление индукционной кривой, но и выявляет ее временные характеристики. Под созданием компактного представления имеется в виду представление индукционной кривой в виде набора из минимального количества параметров, знание которых достаточно для воспроизведения исходной кривой. Мы полагаем, что мультиэкспоненциальное представление данных индукции флуоресценции является перспективным для создания основанных на методах искусственного интеллекта подходов к анализу индукционных кривых.

Нормирование измеренных параметров флуоресценции на величину оптической плотности при  $\lambda = 455$  нм (расчет специфических для  $OD_{455}$  значений  $F_o^*$  и  $F_m^*$ ) оказалось высокоэффективным этапом анализа. Данные, нормированные предложенным способом, показали существенно более высокую чувствительность к  $CuSO_4$  в сравнении с данными, обработанными традиционными методами. Подход с использованием нормированных данных оказался важным для получения надежных и воспроизводимых результатов, позволив отследить влияние ионов меди на фотохимическое и нефотохимическое тушение независимо от вариабельности содержания клеток в образцах, пигментов и их упаковки, что не выявляется традиционными методами.

Микрофлуориметрический метод анализа флуоресценции одиночных клеток оказался более чувствительным и более информативным по сравнению с традиционными измерениями на суспензиях клеток. Данный метод позволил выявить гетерогенность реакции клеток на действие  $CuSO_4$  и обнаружить эффекты ионов меди даже при минимальных концентрациях (0,1 мкМ). Снижение фотохимической активности клеток при инкубации с ионами меди в световых условиях оказалось менее выраженным по сравнению с инкубацией в темновых условиях.

Анализ нормированных ОЛР-кривых позволил детально проследить механизмы действия ионов меди на разных стадиях переноса электронов. Наибольшую чувствительность к воздействию меди проявили параметры  $\delta_{Ro}$  и  $\varphi_{Ro}$  в темновых условиях, которые достоверно снижались не только при воздействии высокой (10 мкМ), но и средней (1 мкМ) концентрациями по сравнению с контролем.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования методов флуоресцентного анализа для ранней диагностики стрессового воздействия тяжелых металлов на фотосинтезирующие организмы. Выявленная гетерогенность реакции клеток на действие ионов меди имеет важное экологическое значение, обеспечивая выживание части популяции в стрессовых условиях. Работа демонстрирует необходимость комплексного подхода при исследовании токсических эффектов, включающего как традиционные методы анализа суспензий клеток, так и современные методы исследования одиночных клеток с применением метода нормирования данных.

## Список литературы (References)

- Волгушева А. А., Конюхов И. В., Антал Т. К. Адаптация первичных реакций фотосинтеза в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* к действию кадмия: анализ гетерогенности популяции // Биофизика. — 2024. — Т. 69, № 3. — С. 478–485. — DOI: 10.31857/S0006302924030063
- Volgusheva A. A., Konyukhov I. V., Antal T. K. Adaptatsiya pervichnykh reaktsiy fotosinteza v kletkakh *Chlamydomonas reinhardtii* k deystviyu kadmia: analiz geterogenosti populyatsii [Adaptation of primary photosynthetic reactions in



- Chlamydomonas reinhardtii* cells to cadmium exposure: analysis of population heterogeneity] // *Biophysics*. — 2024. — Vol. 69, No. 3. — P. 478–485. — DOI: 10.31857/S0006302924030063 (in Russian).
- Маторин Д. Н., Рубин А. Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. — М. — Ижевск: Ижевский институт компьютерных исследований, 2012.
- Matorin D. N., Rubin A. B. Fluorestsentsii khlorofilla vysshikh rasteniy i vodorosley [Chlorophyll fluorescence in higher plants and algae]. — Moscow – Izhevsk: Izhevskij institut komp'yuternykh issledovaniy, 2012 (in Russian).
- Методика выполнения измерений [Электронный ресурс]: ФР.1.39.2007.03223 // Федеральный реестр методик выполнения измерений. — <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16> (дата обращения: 26.03.2025).
- Metodika vypolneniya izmerenii [Measurement procedure]: FR.1.39.2007.03223 // Federal'nyi reestr metodik vypolneniya izmerenii [Federal register of measurement procedures]. — <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16> (accessed: 26.03.2025, in Russian).
- Плюснина Т. Ю., Хрущев С. С., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации // *Биофизика*. — 2015. — Т. 60, № 3. — С. 487–495.
- Plyusnina T. Yu., Khrushchev S. S., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Analysis of chlorophyll fluorescence transient by spectral multi-exponential approximation // *Biophysics*. — 2015. — Vol. 60. — P. 392–399. — <https://doi.org/10.1134/S000635091503015X> (Original Russian paper: Plyusnina T. Yu., Khrushchev S. S., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Analiz kinetiki induksii fluorestsentsii khlorofilla s pomoshch'yu spektral'noi mul'tieksponentsial'noi approksimatsii // *Biofizika*. — 2015. — Vol. 60, No. 3. — P. 487–495.)
- Плюснина Т. Ю., Хрущев С. С., Фролов А. Е., Дегтерева Н. С., Конюхов И. В., Погосян С. И., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Мониторинг фотосинтетической активности культуры микроводорослей *Chlorella* при истощении азота в среде // *Биофизика*. — 2019. — Т. 64, № 3. — С. 468–477. — <https://doi.org/10.1134/S0006302919030062>
- Plyusnina T. Yu., Khrushchev S. S., Frolov A. E., Degtereva N. S., Konyukhov I. V., Pogosyan S. I., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Monitoring of the photosynthetic activity of the microalgae *Chlorella* under nitrogen depletion conditions // *Biophysics*. — 2019. — Vol. 64, No. 3. — P. 358–366. — <https://doi.org/10.1134/S0006350919030175> (Original Russian paper: Plyusnina T. Yu., Khrushchev S. S., Frolov A. E., Degtereva N. S., Konyukhov I. V., Pogosyan S. I., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Monitoring fotosinteticheskoi aktivnosti kul'tury mikrovdoroslei *Chlorella* pri istoshchenii azota v srede // *Biofizika*. — 2019. — Vol. 64, No. 3. — P. 468–477.)
- Ризниченко Г. Ю., Беляева Н. Е., Коваленко И. Б., Антал Т. К., Горячев С. Н., Маслаков А. С., Плюснина Т. Ю., Федоров В. А., Хрущев С. С., Яковлева О. В., Рубин А. Б. Математическое моделирование электронного транспорта в первичных процессах фотосинтеза // *Биохимия*. — 2022. — Т. 87, № 10. — С. 1350–1371.
- Riznichenko G. Yu., Belyaeva N. E., Kovalenko I. B., Antal T. K., Goryachev S. N., Maslakov A. S., Plyusnina T. Yu., Fedorov V. A., Khrushchev S. S., Yakovleva O. V., Rubin A. B. Mathematical simulation of electron transport in the primary photosynthetic processes. — *Biochemistry (Moscow)*. — 2022. — Vol. 87. — P. 1065–1083. — <https://doi.org/10.1134/S0006297922100017> (Original Russian paper: Riznichenko G. Yu., Belyaeva N. E., Kovalenko I. B., Antal T. K., Goryachev S. N., Maslakov A. S., Plyusnina T. Yu., Fedorov V. A., Khrushchev S. S., Yakovleva O. V., Rubin A. B. Matematicheskoe modelirovanie elektronnoogo transporta v pervichnykh protsessakh fotosinteza // *Biokhimiya*. — 2022. — Vol. 87, No. 10. — P. 1350–1371.)
- Хрущев С. С., Дрозденко Т. В., Плюснина Т. Ю., Тимофеев И. В., Тодоренко Д. А., Тихомирова Е. И., Антал Т. К. Выявление токсического воздействия тяжелых металлов на фитопланктон с помощью нейросетевого анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла // *Теоретическая и прикладная экология*. — 2021. — № 2. — С. 134–141. — <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-2-134-141>
- Khrushchev S. S., Drozdenko T. V., Plyusnina T. Yu., Timofeev I. V., Todorenko D. A., Tikhomirova E. I., Antal T. K. Vyyavlenie toksicheskogo vozdeistviya tyazhelykh metallov na fitoplankton s'pomoshch'yu neirosetevogo analiza induktsionnykh krivykh fluorestsentsii khlorofilla [Heavy metal toxicity detection in phytoplankton by using Neural Network analysis of chlorophyll fluorescence induction] // *Theoretical and Applied Ecology*. — 2021. — No. 2. — P. 134–141 (in Russian). — <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-2-134-141>
- Acharya R., Saify T. Copper toxicity on cell morphometry of *Scenedesmus quadricauda* Chodat // *Indian J. Applied & Pure Bio*. — 2012. — Vol. 27, No. 2. — P. 165–171.
- Acharya R., Saify T., Sharma B., Mehta J. Comparative toxicity assessment of NaCl and CuSO<sub>4</sub> on cell plasticity of microalga, *Scenedesmus* sp. Chodat // *Research Journal of Botany*. — 2014. — Vol. 9, No. 1. — P. 9–12.
- Akinyemi O. O., Čepl J., Keski-Saari S., Tomášková I., Stejskal J., Kontunen-Soppela S., Keinänen M. Derivative-based time-adjusted analysis of diurnal and within-tree variation in the OJIP



- fluorescence transient of silver birch // *Photosynthesis Research*. — 2023. — Vol. 157. — P. 133–146. — <https://doi.org/10.1007/s11120-023-01033-x>
- Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khruschev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A.* Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors // *Physiologia Plantarum*. — 2019. — Vol. 165. — P. 476–486. — <https://doi.org/10.1111/ppl.12693>
- Antal T., Rubin A.* In vivo analysis of chlorophyll *a* fluorescence induction // *Photosynthesis Research*. — 2008. — Vol. 96. — P. 217–226. — <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9301-6>
- Antal T.K., Volgusheva A.A., Drozdenko T.V., Konyukhov I.V., Khruschev S.S., Chervitsov R.N., Plyusnina T.Yu., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B.* Analysis of chlorophyll fluorescence induction curves (OJIP transients) of phytoplankton under conditions of high photosynthetic activity // *Journal of Applied Phycology*. — 2025. — <https://doi.org/10.1007/s10811-024-03429-1>
- Antunović Dunić J., Mlinarić S., Pavlović I., Lepeduš H., Salopek-Sondi B.* Comparative analysis of primary photosynthetic reactions assessed by OJIP kinetics in three *Brassica* crops after drought and recovery // *Applied Sciences*. — 2023. — Vol. 13. — Paper 3078. — <https://doi.org/10.3390/app13053078>
- Boisvert S., Joly D., Carpentier R.* Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics // *FEBS J*. — 2006. — Vol. 273. — P. 4770–4777. — <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05475.x>
- Bro R., de Jong S.* A fast non-negativity-constrained least squares algorithm // *Journal of Chemometrics*. — 1997. — Vol. 11, No. 5. — P. 393–401. — DOI: 10.1002/(SICI)1099-128X(199709/10)11:5<393::AID-CEM483>3.0.CO;2-L
- Cavalletti E., Romano G., Palma Esposito F., Barra L., Chiaiese P., Balzano S., Sardo A.* Copper effect on microalgae: toxicity and bioremediation strategies // *Toxics*. — 2022. — Vol. 10. — P. 527. — <https://doi.org/10.3390/toxics10090527>
- Choi M., Davidson V.L.* Cupredoxins — A study of how proteins may evolve to use metals for bioenergetic processes // *Metallomics*. — 2011. — Vol. 3, No. 2. — P. 140–151. — <https://doi.org/10.1039/c0mt00061b>
- Dauda S., Lombardi A.T.* Environmentally relevant copper concentrations stimulate photosynthesis in *Monoraphidium* sp. // *Photosynthesis Research*. — 2023. — Vol. 155, No. 1. — P. 49–58. — <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00976-x>
- Dewez D., Geoffroy L., Vernet G., Popovic R.F.* Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus* // *Aquat. Toxicol.* — 2005. — Vol. 74. — P. 150–159.
- Dong L.-L., Zhang G.-Q., Li W., Ding T., Wang H.-X., Zhang G.* Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  on growth and photosynthesis of two *Scenedesmus* species // *Pol. J. Environ. Stud.* — 2020. — Vol. 29, No. 2. — P. 1129–1135. — <https://doi.org/10.15244/pjoes/105977>
- Efron B., Hastie T., Johnstone I., Tibshirani R.* Least angle regression // *Ann. Statist.* — 2004. — Vol. 32, No. 2. — P. 407–499. — <https://doi.org/10.1214/009053604000000067>
- Fawaz E. G., Kamareddine L. A., Salam D. A.* Effect of algal surface area and species interactions in toxicity testing bioassays // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. — 2019. — Vol. 174. — P. 584–591.
- Gan T., Yin G., Zhao N., Tan X., Wang Y.* A sensitive response index selection for rapid assessment of heavy metals toxicity to the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* based on rapid chlorophyll fluorescence induction kinetics // *Toxics*. — 2023. — Vol. 11. — P. 468. — <https://doi.org/10.3390/toxics11050468>

- García-Cañas R., Giner-Lamia J., Florencio F.J., López-Maury L.* A protease-mediated mechanism regulates the cytochrome  $c_6$ /plastocyanin switch in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2021. — Vol. 118, No. 5. — P. e2017898118. — <https://doi.org/10.1073/pnas.2017898118>
- Govindjee.* Chlorophyll *a* fluorescence: a bit of basics and history // Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis / eds. G. C. Papageorgiou, Govindjee. — Dordrecht: Springer, 2004. — P. 1–42. — <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9>
- Gu M., Yin G., Gan T., Zhao N., Qi P., Chen M., Ding Z., Jia R., Liu J., Ma M., Yang R., Fang L., Liu W.* Construction of characterization parameters of algal photosynthetic inhibition method for detection of comprehensive toxicity in water // Ecological Indicators. — 2022. — Vol. 136. — P. 108651. — <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108651>
- Haldimann P., Strasser R.* Effects of anacrobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.) // Photosynthesis Research. — 1999. — Vol. 62, No. 1. — P. 67–83.
- Haughey M.* Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO<sub>4</sub> treatment // Water Research. — 2000. — Vol. 34, No. 13. — P. 3440–3452. — [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00054-3)
- Van Hullebusch E., Chatenet P., Deluchat V., Chazal P.M., Froissard D., Lens P.N.L., Baudu M.* Fate and forms of Cu in a reservoir ecosystem following copper sulfate treatment (Saint Germain les Belles, France) // Journal de Physique IV (Proceedings). — 2003. — Vol. 107. — P. 1333–1336. — <https://doi.org/10.1051/jp4:20030547>
- Kalaji H.M., Oukarroum A., Alexandrov V., Kouzmanova M., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Allakhverdiev S.I., Goltsev V.* Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll *a* fluorescence measurements // Plant Physiology and Biochemistry. — 2014. — Vol. 81. — P. 16–25. — <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.029>
- Kautsky H., Hirsch A.* Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation // Naturwissenschaften. — 1931. — Vol. 19. — P. 964–964. — <https://doi.org/10.1007/BF01516164>
- Khruschev S.S., Plyusnina T.Yu., Antal T.K., Pogosyan S.I., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B.* Machine learning methods for assessing photosynthetic activity: environmental monitoring applications // Biophysical Reviews. — 2022. — Vol. 14. — P. 821–842. — <https://doi.org/10.1007/s12551-022-00982-2>
- Kovacik J., Klejdus B., Hedbavny J., Backor M.* Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) // Plant Science. — 2010. — Vol. 178. — P. 307–311.
- Kuznetsov A.G., Konyukhov I.V., Pogosyan S.I., Rubin A.B.* Microfluorimeter for studying the state of photosynthetic apparatus of individual cells of microalgae // Oceanology. — 2021. — Vol. 61. — P. 1055–1063. — <https://doi.org/10.1134/S0001437021060278>
- Lawson C., Hanson R.J.* Solving least squares problems. — SIAM, 1995. — <https://doi.org/10.1137/1.9781611971217>
- Li H., Wang J., Zhang E., Shao Y., Yang L., Yang B., Tan Y., Gao T.* Cumulative effects of physical, chemical, and biological measures on algae growth inhibition // Water. — 2022. — Vol. 14. — P. 877. — <https://doi.org/10.3390/w14060877>
- Lyu H., Lazár D.* Assessing key parameters in simultaneous simulation of rapid kinetics of chlorophyll *a* fluorescence and trans-thylakoid electric potential difference // Physiologia Plantarum. — 2024. — Vol. 176. — Paper e14517. — <https://doi.org/10.1111/pp1.14517>
- Mallick N., Mohn F.H.* Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus* // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2003. — Vol. 55, No. 1. — P. 64–69.

- Miramar M.D., Inda L.A., Saraiva L.M., Peleato M.L. Plastocyanin/cytochrome  $c_6$  interchange in *Scenedesmus vacuolatus* // Journal of plant physiology. — 2003. — Vol. 160, No. 12. — P. 1483–1486. — <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01009>
- Odland T. KDEpy: v1.1.8 // Zenodo. — 2023. — <https://doi.org/10.5281/zenodo.8422073>
- Oukarroum A., Perreault F., Popovic R. Interactive effects of temperature and copper on photosystem ii photochemistry in *Chlorella vulgaris* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. — 2012. — Vol. 110. — P. 9–14.
- Padhi B., Chauhan G., Kandoi D., Stirbet A. A comparison of chlorophyll fluorescence transient measurements, using Handy PEA and FluorPen fluorometers // Photosynthetica. — 2021. — Vol. 59, No. 1. — P. 104–114. — DOI:10.32615/ps.2021.026
- Perales-Vela H.V., Gonzalez-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Cañizares-Villanueva R.O. Growth, photosynthetic, and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) // Chemosphere. — 2007. — Vol. 67. — P. 2274–2281.
- Plyusnina T. Yu., Khrushev S. S., Degtereva N. S., Konyukhov I. V., Solovchenko A. E., Kouzmanova M., Goltsev V.N., Riznichenko G. Yu., Rubin A.B. Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion during microalgae cultivation in photobioreactor // Photosynthetica. — 2020. — Vol. 58 (SI). — P. 443–451. — <https://doi.org/10.32615/ps.2020.002>
- Pospíšil P., Dau H. Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution // Photosynthesis Research. — 2000. — Vol. 65. — P. 41–52. — <https://doi.org/10.1023/A:1006469809812>
- Redinbo M. R., Yeates T. O., Merchant S. Plastocyanin: Structural and functional analysis // J. Bioenerg. Biomembr. — 1994. — Vol. 26. — P. 49–66. — <https://doi.org/10.1007/BF00763219>
- Riznichenko G. Yu., Lebedeva G. V., Pogosyan S. I., Sivchenko M., Rubin A. Fluorescence induction curves registered from individual microalgae coenobiums in the process of population growth // Photosynthesis Research. — 1996. — Vol. 5. — P. 1–7.
- Rocha G. S., Parrish C. C., Espíndola E. L. G. Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae) // Algal Research. — 2021. — Vol. 54. — P. 102223. — DOI: 10.1016/j.algal.2021.102223
- De la Rosa M.A., Molina-Heredia F.P., Hervás M., Navarro J.A. Convergent evolution of cytochrome  $c_6$  and plastocyanin // Photosystem I: The light-driven plastocyanin:ferredoxin oxidoreductase / ed. J.H. Golbeck. — Advances in Photosynthesis and Respiration. — Springer, 2006. — Vol. 24. — P. 683–696. — [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0\\_40](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0_40)
- Salem O.M.A. The effect of chloramphenicol and copper on the cell ultrastructure of *Scenedesmus* sp. // Egyptian J. of Phycol. — 2014. — Vol. 15. — P. 1–10. — <https://doi.org/10.21608/egyjs.2014.115219>
- Singh H., Kumar D., Soni V. Performance of chlorophyll a fluorescence parameters in *Lemna minor* under heavy metal stress induced by various concentration of copper // Scientific Reports. — 2022. — Vol. 12. — P. 10620.
- Spain O., Plöhn M., Funk C. The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal // Physiologia Plantarum. — 2021. — Vol. 173. — P. 526–535.
- Stirbet A., Govindjee. On the relation between the kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient // J. Photochem. Photobiol. — 2011. — Vol. 104. — P. 236–257. — <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>
- Strasser B. J., Strasser R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test // Photosynthesis: from light to biosphere. — Vol. 5 / ed. P. Mathis. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. — P. 977–980.

- Strasser R., Tsimilli-Michael M., Dangre D., Rai M.* Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the evaluation of the impact of mycorrhization with *Piriformospora indica* // *Advanced techniques in soil microbiology* / A. Varma, R. Oelmüller (eds). — Berlin: Springer, 2007. — P. 319–341.
- Strasser R. J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A.* Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient // *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. — *Advances in Photosynthesis and Respiration*. — Vol. 19 / eds. G. C. Papageorgiou, Govindjee. — Dordrecht: Springer, 2004. — P. 321–362.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R. J.* *In vivo* assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of mycorrhization on host plants // *Mycorrhiza: state of the art. Genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. — 3rd ed. / ed. A. Varma. — Dordrecht: Springer, 2008. — P. 679–703.
- Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., Haberland M., Reddy T., Cournapeau D., Burovski E., Peterson P., Weckesser W., Bright J., van der Walt S.J., Brett M., Wilson J., Millman J., Mayorov N., Nelson A.R.J., Jones E., Kern R., Larson E., Carey C.J., Polat İ., Feng Yu, Moore E.W., VanderPlas J., Laxalde D., Perktold J., Cimrman R., Henriksen I., Quintero E.A., Harris C.R., Archibald A.M., Ribeiro A.H., Pedregosa F., van Mulbregt P., and SciPy 1.0 contributors.* SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // *Nature Methods*. — 2020. — Vol. 17, No. 3. — P. 261–272. — <https://10.1038/s41592-019-0686-2>
- Volgusheva A. A., Todorenco D. A., Konyukhov I. V., Voronova E. N., Pogosyan S. I., Plyusnina T. Yu., Khruschev S. S., Antal T. K.* Acclimation response of green microalgae *Chlorella sorokiniana* to 2,3',4,4',6-pentachlorobiphenyl // *Photochemistry and Photobiology*. — 2023. — Vol. 99. — P. 1106–1114. — <https://doi.org/10.1111/php.13771>
- Wang H., Sathasivam R., Ki J.-S.* Physiological effects of copper on the freshwater alga *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae) and its potential use in toxicity assessments // *Algae*. — 2017. — Vol. 32, No. 2. — P. 131–137.
- Xu X.-P., Yang X.-F., Wei X.-Y., Xi Y.-L., Wang X.-M.* Studies on toxicity and bioaccumulation of  $Cu^{2+}$  in alga *Scenedesmus obliquus* and its effect on life table demography of the rotifer *Brachionus calyciflorus* // *Pol. J. Environ. Stud.* — 2021. — Vol. 30, No. 1. — P. 893–901.
- Yong W.-K., Sim K.-S., Poong S.-W., Wei D., Phang S.-M.* Interactive effects of temperature and copper toxicity on photosynthetic efficiency and metabolic plasticity in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) // *Journal of Applied Phycology*. — 2018. — Vol. 30. — P. 3029–3041.