

Выявление токсического воздействия тяжёлых металлов на фитопланктон с помощью анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла методами машинного обучения

© 2023. Т. Ю. Плюснина¹, к. ф.-м. н., доцент,
 Р. Н. Червицов¹, студент, С. С. Хрущев¹, к. б. н., в. н. с.,
 Д. Г. Киселева¹, аспирант, Т. В. Дрозденко², к. б. н., доцент, с. н. с.,
 Е. И. Тихомирова³, д. б. н., профессор,
 Г. Ю. Ризниченко¹, д. ф.-м. н., профессор, Т. К. Антал², д. б. н., г. н. с.,
¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
 119991, Россия, г. Москва, ул. Колмогорова, д. 1,
²Псковский государственный университет,
 180000, Россия, г. Псков, пл. Ленина, д. 2,
³Саратовский государственный технический университет
 имени Гагарина Ю. А.,
 410054, Россия, г. Саратов, ул. Политехническая, д. 77,
 e-mail: plusn@yandex.ru, styx@biophys.msu.ru, taras_an@mail.ru

Создание сети автономных станций биоиндикации состояния водных объектов требует разработки методов анализа больших массивов данных. В данной работе показано, каким образом сочетание методов машинного обучения с традиционными статистическими методами может быть использовано для выявления неявных закономерностей в массиве данных по действию тяжёлых металлов на природный фитопланктон. Массив экспериментальных данных представляет собой 465 кривых индукции флуоресценции, измеренных на образцах фитопланктона из 9 водоёмов Псковской области, и отражающих динамику переноса электрона в фотосинтетическом аппарате клеток водорослей. Каждая кривая характеризуется 14 параметрами JIP-теста, часть из которых непосредственно описывают форму кривой, другая часть параметров связывает форму кривой с энергетическими потоками, возникающими в фотосинтетическом аппарате в ответ на получение клеткой кванта света. На базе массива параметров JIP-теста методами кластерного анализа был проведён анализ различий в фотосинтетической активности проб фитопланктона из 9 водоёмов Псковской области в контроле и при долгосрочном воздействии солей кадмия и хрома. В контрольных пробах были выявлены две группы, различающиеся фотосинтетической активностью фитопланктона. Предполагается, что более низкая фотосинтетическая активность проб фитопланктона связана с антропогенной нагрузкой на водоёмы, из которых были взяты соответствующие образцы. Показано, что в пробах с изначально низкой активностью фотосинтетического аппарата токсическое действие тяжёлых металлов проявляется на более поздних сроках инкубации по сравнению с более активными пробами. Предложенный подход может быть легко масштабирован для анализа больших массивов экспериментальных данных, что делает его перспективным инструментом для раннего обнаружения токсического загрязнения природных вод.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, водные экосистемы, фитопланктон, экологический мониторинг, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, машинное обучение, кластерный анализ.

Identification of the toxic effects of heavy metals on phytoplankton by the analysis of chlorophyll fluorescence induction curves using machine learning

© 2023. T. Yu. Plyusnina¹ ORCID: 0000-0002-0734-1727, R. N. Chervitsov¹ ORCID: 0000-0003-3310-6517,
 S. S. Khrushchev¹ ORCID: 0000-0002-4714-6221, D. G. Kiseleva¹ ORCID: 0000-0001-8149-349X,
 T. V. Drozdenko² ORCID: 0000-0002-5553-2296, E. I. Tikhomirova³ ORCID: 0000-0001-6030-7344,
 G. Yu. Riznichenko¹ ORCID: 0000-0001-7784-3207, T. K. Antal² ORCID: 0000-0002-9690-8034,

¹Lomonosov Moscow State University,
 1, Kolmogorova St., Moscow, Russia, 119991,
²Pskov State University,
 2, Lenina Square, Pskov, Russia, 180000,

³Yuri Gagarin State Technical University of Saratov,
77, Politekhnikeskaya St., Saratov, Russia, 410054,
e-mail: plusn@yandex.ru, styx@biophys.msu.ru, taras_an@mail.ru

The creation of a network of autonomous stations for bioindication of water bodies state requires the development of methods for analyzing large data arrays. The combination of machine learning methods with traditional statistical methods is used to identify implicit patterns in the dataset for the effect of heavy metals on natural phytoplankton. The array of experimental data consists of 465 fluorescence induction curves measured on phytoplankton samples from 9 water bodies of the Pskov region, and reflecting the dynamics of electron transfer in the photosynthetic apparatus. Each curve is characterized by 14 JIP-test parameters, some of which directly describe the shape of the curve; the others connect the shape of the curve with the energy flows that occur in the photosynthetic apparatus under illumination. Cluster analysis based on a set of JIP-test parameters was used to distinguish photosynthetic activity first among phytoplankton samples in control and then under long-term exposure to cadmium and chromium salts. In the control samples, two groups were identified that differ in the photosynthetic activity of phytoplankton. It is assumed that the lower photosynthetic activity of phytoplankton samples is associated with anthropogenic pressure on the water bodies. It was shown that the samples with initially low photosynthetic activity responded to the toxic effect of heavy metals at later periods of incubation compared to more active samples. The proposed approach can be easily scaled to analyze large arrays of experimental data that makes it a promising tool for the early detection of toxic pollution of natural waters.

Keywords: heavy metals, aquatic ecosystems, phytoplankton, environmental monitoring, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, machine learning, cluster analysis.

Тяжёлые металлы (ТМ) – одни из наиболее распространённых загрязнителей, поэтому актуально изучение их содержания в объектах окружающей среды. Соли ТМ токсичны для фотосинтезирующих организмов и могут вызывать повреждения клеток и нарушение процессов фотосинтеза. В частности, ТМ могут взаимодействовать с SH-группами белков, а также встраиваться в металлосодержащие соединения вместо необходимого иона [1–5]. Ионы металлов с переменной валентностью могут вызывать генерацию свободных радикалов. Кроме того, дихромат-ионы ($Cr_2O_7^{2-}$) являются сильными окислителями и способны окислять белки и мембранные липиды. В связи с этим, возникает необходимость выявить наличие ионов ТМ в среде как можно раньше. В данной работе мы рассматриваем действие ТМ на микроводоросли для определения методики выявления загрязнений путём биоиндикации.

Поскольку в разных водных объектах таксономический состав фитопланктона и химический состав воды различаются, то и реакция фитопланктона из различных водных объектов на загрязнение также может быть неодинакова.

В качестве экспресс-теста для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата (ФСА) растений часто используется регистрация кинетики возрастания (индукции) флуоресценции хлорофилла *a* под действием света [6]. Интенсивность флуоресценции определяется окислительно-восстановительным состоянием компонентов фотосинтетической электрон-транспортной

цепи, поэтому, так как ТМ действуют на ФСА, форма индукционной кривой меняется при действии ТМ.

Наиболее широко используемым методом анализа индукционных кривых является JIP-тест [6], который связывает изменение формы кривой с изменениями в ФСА. Различные параметры JIP-теста позволяют охарактеризовать отдельные стадии переноса электрона по электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Снижение максимального квантового выхода первичной фотохимической реакции (Φ_{P_0}) обычно свидетельствует о повреждении донорной стороны фотосистемы 2 (ФС2) [7]. Изменение параметра ABS/RC (потока поглощённой световой энергии на реакционный центр ФС2) обычно связывают с изменением эффективной площади сечения светособирающей антенны. Увеличение ABS/RC часто происходит при уменьшении количества активных реакционных центров ФС2, например, при температурном [8, 9] или токсическом стрессе [10]. Уменьшение параметра ψ_0 , характеризующего вероятность переноса электрона с ФС2 в пул пластохинонов (ПХ), означает замедление электронного транспорта. Это происходит при перевосстановлении ПХ, что может быть вызвано как ингибированием более поздних стадий электронного транспорта, так и замедлением темновых стадий фотосинтеза (цикла Кальвина – Бенсона – Бассама) [9]. На значение индекса производительности (PI_{ABS}) влияют практически любые изменения в ФСА, что позволяет его использовать для обнаружения общего снижения активно-

сти ФСА при действии различных факторов стресса (нагревание, охлаждение, действие токсикантов, нехватка азота) [8, 9, 11].

Создание сети автономных станций биоиндикации состояния водных объектов требует разработки методов анализа больших массивов данных. Применение методов машинного обучения, таких как искусственные нейронные сети и кластерный анализ, позволяет существенно ускорить и автоматизировать обработку массивов экспериментальных данных [12]. Нами был представлен прототип искусственной нейронной сети, позволяющий выявлять токсическое действие ТМ на природный фитопланктон. При анализе проб из девяти разнотипных водных объектов Псковской области точность выявления действия ТМ достигала 90% [13].

В отличие от представленной в [13] нейросети, выполняющей прикладную задачу – обнаружение в пробах ТМ, кластерный анализ может быть полезным для решения более общей задачи – упорядочивания большого массива проб фитопланктона из различных водоёмов с выделением групп с различными характеристиками фотосинтетического аппарата. Анализ фотосинтетических характеристик в каждой группе может выявить потенциальные возможности ответа клеток на действие различных факторов стресса, в частности, ТМ.

При анализе большого массива экспериментальных данных важной является возможность его визуализации. Для характеристики фотосинтетического аппарата используется большое (более десяти) число параметров ЛР-теста, которые образуют многомерное пространство. Чтобы визуализировать данные, необходимо уменьшить размерность этого пространства. Среди методов машинного обучения широко используется метод главных компонент (РСА), осуществляющий поиск таких линейных комбинаций исходных признаков, при котором происходит наименьшая потеря информации [14]. Из нелинейных методов часто используются *t*-SNE [15] и UMAP [16], осуществляющие уменьшение размерности исходного пространства признаков так, чтобы расстояния между объектами, далёкими в исходном пространстве, оставались большими в новом пространстве, а расстояния между близкими объектами – малыми. В результате массив данных можно наглядно представить на плоскости или в объёме. Часто уменьшение размерности используется в качестве предварительного этапа перед кластеризацией.

Цель работы: исследовать, насколько однородной по своим фотосинтетическим характеристикам является выборка проб фитопланктона из 9 природных водоёмов Псковской области. Из массива исходных данных – кривых индукции флуоресценции, полученных на образцах фитопланктона из исследуемых водоёмов, методами кластерного анализа предполагается выделить группы со сходными характеристиками фотосинтетического аппарата и проанализировать реакцию фитопланктона в каждой группе на действие тяжёлых металлов.

Объекты и методы исследования

Экспериментальные данные, анализируемые в работе, подробно описаны в [13]. Пробы природного фитопланктона были отобраны с поверхностного горизонта 9 водных объектов, расположенных в Псковской области: дельты р. Великой, р. Камёнка, пруда на р. Мирожке, озёр Чудского, Псковского, Тёплого, Калацкого, Лесицкого и Тиглицы. Каждая проба была разделена на шесть частей, две из них выступали в качестве контроля, а в остальные были добавлены токсиканты (CdSO_4 или $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) в концентрации 20 мкМ и 50 мкМ. Эти пробы инкубировали в люминостате при интенсивности света 50 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$) с периодом освещения: 12/12 ч день/ночь при температуре 20–22 °С несколько суток, и через каждые 3–5 ч (с перерывами на ночь) проводилось измерение кривых индукции флуоресценции (ОЛР кривых) с помощью прибора AquaPen-C 100 (Photon System Instruments, Чехия) при интенсивности вспышки 1000 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$) и длине волны 650 нм. Всего было получено 465 кривых индукции флуоресценции, для каждой из них были рассчитаны параметры ЛР-теста [6]. Полученные данные были сгруппированы по двум временным интервалам – от 0 до 9 ч инкубации, и от 17 до 33 ч инкубации.

Анализ данных проводили с помощью средств языка программирования Python. Для анализа использовали 14 параметров ЛР-теста, характеризующих активность ФСА и не зависящих от биомассы фитопланктона в пробе. Были выбраны как исходные параметры, полученные непосредственно из самой кривой и характеризующие её форму – V_i , V_i' , M_0 , S_m , S_s , N , так и параметры, составленные из исходных, характеризующие различные энергетические потоки – ABS/RC , DI_0/RC , ET_0/RC , TR_0/RC и общую эффективность

работы ФСА – φ_{Po} , φ_{Eo} , φ_{Pav} , PI_{ABS} . Подробное описание значения параметров JIP-теста даётся в [6]. 108 индукционных кривых, полученных на первых 33 часах инкубации без добавления токсикантов, использовали для сравнения фотосинтетической активности фитопланктона отдельных проб.

Предварительное исследование массива данных, так называемый разведочный анализ, проводили с использованием пакета pandas (библиотека Python, используемая для работы с табличными данными, <https://pandas.pydata.org/>). Для каждого параметра JIP-теста построены ядерные оценки плотности распределения, для каждой пары параметров – построены диаграммы рассеяния и рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Для визуализации данных использовали библиотеки Python Matplotlib (<https://matplotlib.org/>) и seaborn (<https://seaborn.pydata.org/>).

Кластерный анализ проводили после уменьшения размерности данных с помощью сочетания методов PCA и *t*-SNE (вариант 1), PCA и UMAP (вариант 2) с помощью метода *k*-средних из пакета scikit-learn (<https://scikit-learn.org/>). Для выбора оптимального количества кластеров вычислялся коэффи-

циент силуэта (silhouette score) для каждого варианта кластеризации.

Определение достоверности различий между выборками проводили с помощью непараметрического статистического U-критерия Манна-Уитни из пакета SciPy (<https://scipy.org/>). Различия между выборками считали значимыми, если *p*-значение было меньше 0,05.

Результаты и обсуждение

Разведочный анализ данных для 108 измерений без добавления токсиканта показал, что распределения всех параметров JIP-теста являются унимодальными. На попарных диаграммах рассеяния не было выявлено каких-либо обособленных друг от друга групп точек. Показано, что имеются значительные корреляции между параметрами JIP-теста (табл. 1). Наиболее сильно связаны параметры, характеризующие потоки энергии в расчёте на реакционный центр (DI_0/RC , ET_0/RC , TR_0/RC).

Для уменьшения размерности пространства признаков был применён метод главных компонент (PCA). Показано, что первые 2 главные компоненты описывают 64% разброса данных, 3 – 86%, 7 – 99%. Вклады (факторные

Таблица 1 / Table 1
Коэффициенты корреляции Пирсона для параметров JIP-теста для 108 измерений без добавления токсиканта / Pearson correlation coefficients for JIP test parameters of 108 fluorescence transients of control samples

Параметр Parameter	V_j	V_i	M_0	S_m	S_s	N	φ_{Po}	φ_{Eo}	φ_{Pav}	$\frac{ABS}{RC}$	$\frac{DI_0}{RC}$	$\frac{ET_0}{RC}$	$\frac{TR_0}{RC}$	PI_{ABS}
V_j	1,00	0,51	0,56	0,13	-0,04	0,19	-0,22	-0,78	0,39	0,24	0,25	-0,09	0,20	-0,23
V_i	0,51	1,00	0,42	0,07	-0,06	0,23	-0,07	-0,38	0,52	0,30	0,29	0,15	0,29	-0,17
M_0	0,56	0,42	1,00	0,22	-0,21	0,71	-0,05	-0,39	0,28	0,88	0,86	0,69	0,89	-0,32
S_m	0,13	0,07	0,22	1,00	0,05	0,72	-0,36	-0,32	0,61	0,28	0,33	0,13	0,18	-0,03
S_s	-0,04	-0,06	-0,21	0,05	1,00	-0,15	0,07	0,07	0,00	-0,18	-0,17	-0,18	-0,21	0,82
N	0,19	0,23	0,71	0,72	-0,15	1,00	-0,21	-0,26	0,42	0,82	0,83	0,69	0,75	-0,22
φ_{Po}	-0,22	-0,07	-0,05	-0,36	0,07	-0,21	1,00	0,78	-0,44	-0,15	-0,24	0,11	0,05	0,40
φ_{Eo}	-0,78	-0,38	-0,39	-0,32	0,07	-0,26	0,78	1,00	-0,55	-0,24	-0,31	0,12	-0,10	0,42
φ_{Pav}	0,39	0,52	0,28	0,61	0,00	0,42	-0,44	-0,55	1,00	0,23	0,27	0,03	0,14	-0,22
$\frac{ABS}{RC}$	0,24	0,30	0,88	0,28	-0,18	0,82	-0,15	-0,24	0,23	1,00	0,99	0,90	0,97	-0,27
$\frac{DI_0}{RC}$	0,25	0,29	0,86	0,33	-0,17	0,83	-0,24	-0,31	0,27	0,99	1,00	0,86	0,93	-0,27
$\frac{ET_0}{RC}$	-0,09	0,15	0,69	0,13	-0,18	0,69	0,11	0,12	0,03	0,90	0,86	1,00	0,95	-0,18
$\frac{TR_0}{RC}$	0,20	0,29	0,89	0,18	-0,21	0,75	0,05	-0,10	0,14	0,97	0,93	0,95	1,00	-0,26
PI_{ABS}	-0,23	-0,17	-0,32	-0,03	0,82	-0,22	0,40	0,42	-0,22	-0,27	-0,27	-0,18	-0,26	1,00

Таблица 2 / Table 2

Вклад (факторная нагрузка) параметров JIP-теста в первые три главные компоненты PCA
 Contribution (factor loadings) of JIP test parameters to the first three principal components PCA

Параметр Parameter	V_j	V_i	M_0	S_m	S_s	N	Φ_{Po}	Φ_{Eo}	Φ_{Pav}	$\frac{ABS}{RC}$	$\frac{DI_0}{RC}$	$\frac{ET_0}{RC}$	$\frac{TR_0}{RC}$	PI_{ABS}
PCA0	0,45	0,45	0,91	0,45	-0,28	0,87	-0,30	-0,48	0,47	0,94	-0,95	0,76	0,89	-0,43
PCA1	0,57	0,32	-0,12	0,31	-0,02	-0,11	-0,68	-0,81	0,61	-0,31	-0,23	-0,61	-0,44	-0,29
PCA3	-0,02	0,05	-0,04	0,48	0,86	0,25	0,04	0,04	0,029	0,03	0,06	-0,01	-0,02	0,79

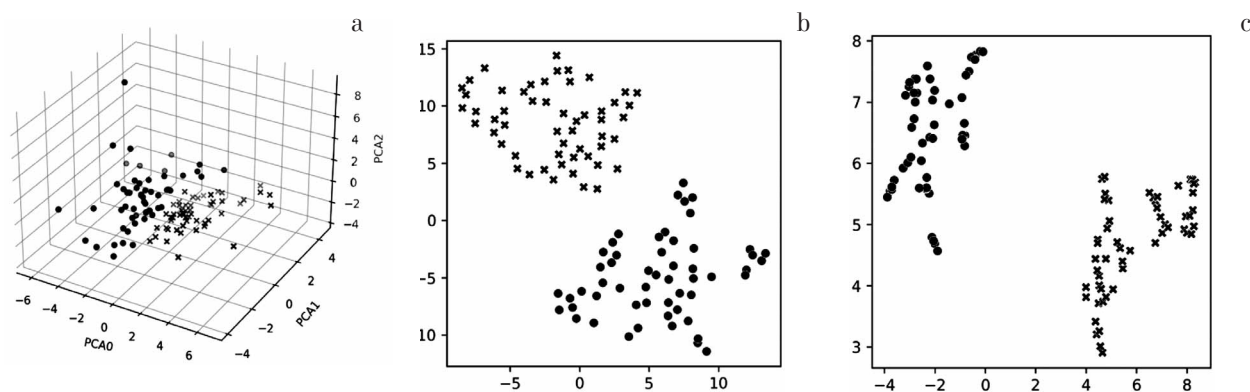


Рис. 1. Представление данных для 108 измерений без добавления токсиканта в трёхмерном пространстве с использованием преобразования PCA (а) и на плоскости с использованием преобразований PCA-t-SNE (b) и PCA-UMAP (c). Результаты разбиения на два кластера по методу *k*-средних показаны формой маркера: × – кластер 1, ● – кластер 2

Fig. 1. Representation of data for 108 measurements without the addition of a toxicant in 3D using PCA transformation (a) and on a plane using the PCA-t-SNE (b) and PCA-UMAP (c) transformations. The results of splitting into two clusters using the *k*-means method are shown by the shape of markers: × – cluster 1, ● – cluster 2

нагрузки) параметров JIP-теста в первые три главные компоненты представлены в таблице 2. Анализ вклада параметров JIP-теста не выявил параметра, который давал бы преимущественный вклад в наблюдаемый разброс, а отображение данных на трёхмерном графике в координатах первых трёх главных компонент (рис. 1а) не позволило выявить какую-либо структуру данных.

Тем не менее, дальнейшее уменьшение размерности данных с помощью нелинейных алгоритмов *t*-SNE (рис. 1b) и UMAP (рис. 1c) позволило выявить чёткое разделение набора данных на две группы. Это разделение было подтверждено кластерным анализом по методу *k*-средних. Для проверки качества кластеризации использовалось сравнение силуэт-метрики для различного количества кластеров. В итоге, наиболее высокое среднее значение силуэта для PCA совместно с *t*-SNE составило 0,6 для двух кластеров, а для PCA совместно с UMAP также для двух кластеров значение силуэта достигало 0,77. Состав кластеров (табл. 3) идентичен для преобразований PCA-t-SNE и PCA-UMAP.

Из данных таблицы 3 можно видеть, что результаты измерений распределены по кла-

стерам неравномерно по отдельным пробам и срокам инкубации. Для проб из большинства водных объектов можно отметить, что по мере увеличения срока инкубации доля измерений, отнесённых к кластеру 2, уменьшается. Для проб из трёх водных объектов (оз. Тиглицы, пруд на р. Мирожке и оз. Лесицкое) не менее половины измерений, проведённых в начале инкубации (на первых 9 ч) относятся к кластеру 1, для остальных проб большинство измерений относятся к кластеру 2.

Попарное сравнение проб по критерию Манна-Уитни (в таблице 4 приведены результаты сравнения по величине первой главной компоненты PCA0, похожие результаты получены для других главных компонент и отдельных параметров JIP-теста) позволило выделить две группы проб (выделены цветом в таблице 4), в пределах которых достоверные различия отсутствуют, и в то же время каждая проба, отнесённая к одной группе, достоверно отличается хотя бы от одной пробы другой группы. Принимая во внимание как результаты теста Манна-Уитни, так и результаты кластерного анализа, мы выдвинули гипотезу о том, что по параметрам функциональной активности

Таблица 3 / Table 3

Количество измерений, отнесённых к разным кластерам для отдельных проб, отобранных из разных водных объектов при различных сроках инкубации / Number of measurements assigned to different clusters for individual samples taken from different water bodies at different incubation periods

Водный объект Water body	Число измерений / Number of samples						Доля измерений в кластере 2, % Share of samples in cluster 2, %		
	кластер 1 cluster 1			кластер 2 cluster 2					
	0–9 ч / h	17–33 ч / h	0–33 ч / h	0–9 ч / h	17–33 ч / h	0–33 ч / h	0–9 ч / h	17–33 ч / h	0–33 ч / h
Оз. Тиглицы / Lake Tiglitsy	4	5	9	0	1	1	0	17	10
Пруд на р. Мировжке Pond of the Mirozhka River	7	5	12	1	1	2	13	17	14
Оз. Лесицкое / Lake Lesitskoe	2	4	6	2	2	4	50	33	40
Оз. Чудское / Lake Chudskoe	2	5	7	4	1	5	67	17	42
Оз. Тёплое / Lake Teploe	1	5	6	5	1	6	83	17	50
Оз. Псковское / Lake Pskovskoe	3	2	5	3	4	7	50	67	58
Оз. Калацкое / Lake Kalatskoe	0	3	3	2	3	5	100	50	63
Р. Великая (1) / The Velikaya River (1)	1	3	4	5	3	8	83	50	67
Р. Камёнка / The Kamyonka River	0	1	1	3	2	5	100	67	83
Р. Великая (2) / The Velikaya River (2)	0	1	1	6	4	10	100	80	91

Таблица 4 / Table 4

Различия между пробами, отобранными из различных водных объектов (обозначены латинскими буквами А–J), в контроле по первой главной компоненте (РСА0) на первых 33 часах инкубации (*p*-значения критерия Манна-Уитни)

Differences between samples taken from different water bodies (indicated by letters A–J) in the control for the first principal component (РСА0) at the first 33 hours of incubation (*p*-values of the Mann-Whitney test)

Водный объект Water body		Группа 1 / Group 1			Группа 2 / Group 2						
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Оз. Тиглицы Lake Tiglitsy	A	–	0,215	0,236	0,133	0,069	0,026	0,053	0,022	0,058	$4,37 \cdot 10^{-5}$
Пруд на р. Мировжке Pond of the Mirozhka River	B	0,215	–	0,309	0,103	0,030	0,011	0,030	0,007	0,045	$2,17 \cdot 10^{-5}$
Оз. Лесицкое Lake Lesitskoe	C	0,236	0,309	–	0,115	0,026	0,008	0,014	0,014	0,029	$4,37 \cdot 10^{-5}$
Оз. Чудское Lake Chudskoe	D	0,133	0,103	0,115	–	0,454	0,364	0,394	0,167	0,474	0,008
Оз. Тёплое Lake Teploe	E	0,069	0,030	0,026	0,454	–	0,185	0,443	0,118	0,444	$7,79 \cdot 10^{-5}$
Оз. Псковское Lake Pskovskoe	F	0,026	0,011	0,008	0,364	0,185	–	0,253	0,292	0,372	0,003
Оз. Калацкое Lake Kalatskoe	G	0,053	0,030	0,014	0,394	0,443	0,253	–	0,107	0,481	$4,87 \cdot 10^{-5}$
Р. Великая (1) The Velikaya River (1)	H	0,022	0,007	0,014	0,167	0,118	0,292	0,107	–	0,187	0,107
Р. Камёнка The Kamyonka River	I	0,058	0,045	0,029	0,474	0,444	0,372	0,481	0,187	–	0,007
Р. Великая (2) The Velikaya River (2)	J	$4,37 \cdot 10^{-5}$	$2,17 \cdot 10^{-5}$	$4,37 \cdot 10^{-5}$	0,008	$7,79 \cdot 10^{-5}$	0,003	$4,87 \cdot 10^{-5}$	0,107	0,007	–

Примечание: полужирным шрифтом выделены различия, достоверные при уровне значимости 0,05. Прочерк обозначает, что сравнение пробы с самой собой не проводится. Серым цветом выделены группы проб, достоверные различия между которыми отсутствуют.

Note: Values in bold represent differences significant at a significance level of 0.05. Dash means that the comparison of a sample with itself was not performed. Groups of samples between which there are no significant differences are marked in gray.

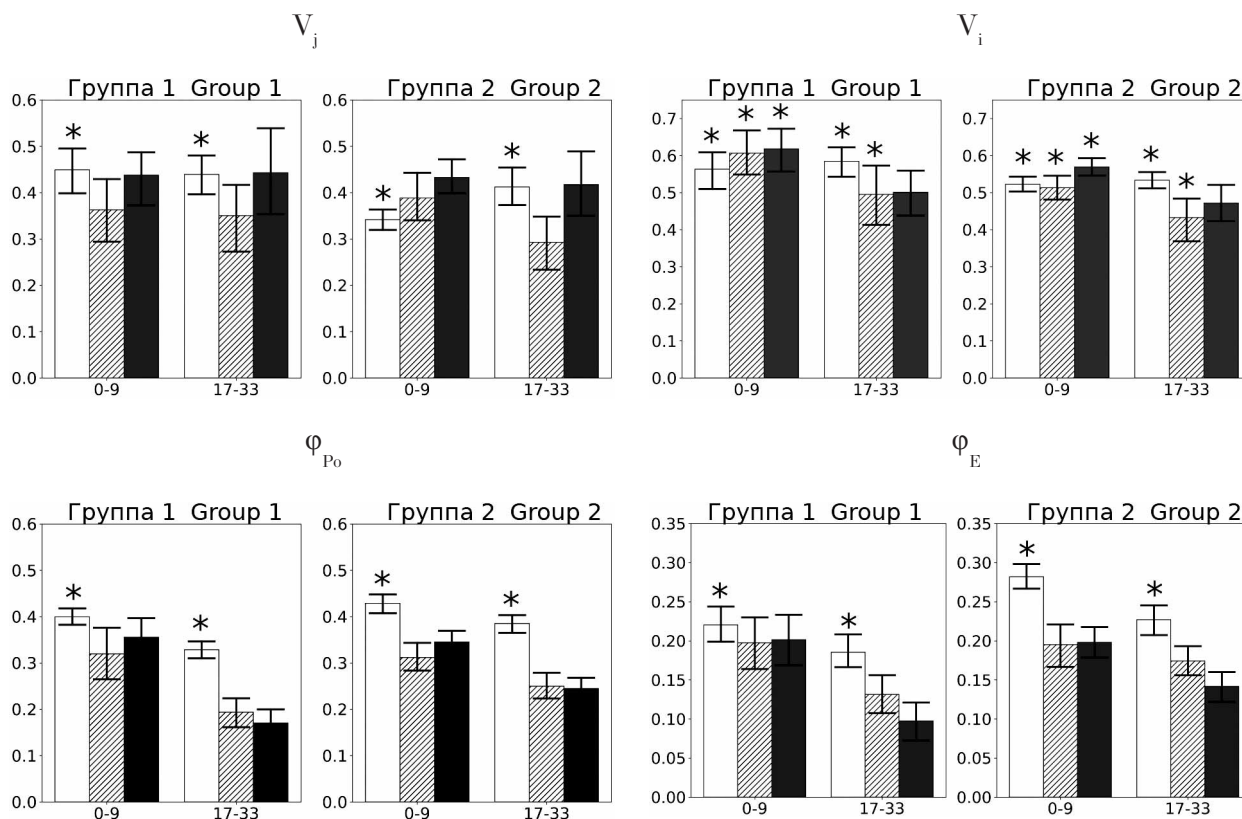


Рис. 2. Средние значения основных параметров JIP-теста.

Контроль – белый, инкубация с сульфатом кадмия – штриховка, инкубация с дихроматом калия – тёмно-серый. Отрезками показаны выборочные стандартные отклонения для параметров. Звёздочкой отмечены значения, достоверно различающиеся между группами по критерию Манна-Уитни при уровне значимости 0,05

Fig. 2. The average values of the main JIP test parameters. Control – white, incubated with cadmium sulfate – hatched, incubated with potassium dichromate – dark gray.

Bars show sample standard deviations for parameters. An asterisk indicates values that significantly differ between groups according to the Mann-Whitney test at a significance level of 0.05

ФСА анализируемые пробы можно разделить на две группы. Пробы, отобранные из оз. Тиглицы, пруда р. Мирожки и оз. Лесицкое (А–С), мы обозначили как группа 1, остальные (D–J) – группа 2.

Различия между двумя предполагаемыми группами по основным параметрам активности фотосинтетического аппарата (V_j , V_i , Φ_{Po} , Φ_{Eo}) в контроле являются достоверными при уровне значимости 0,05 (рис. 2). При действии ТМ происходит снижение максимального квантового выхода первичной фотохимической реакции Φ_{Po} и максимального квантового выхода электронного транспорта Φ_{Eo} . В пробах, относящихся к группе 2, это снижение явно выражено уже на первых часах инкубации с ТМ, в то время как в пробах, относящихся к группе 1, оно проявляется только после 17 ч инкубации. Это свидетельствует о разной динамике развития токсического эффекта в этих группах проб. Следует отметить, что как Φ_{Po} , так и Φ_{Eo} проб группы 1 достоверно ниже по сравнению с группой 2, что может указывать

на то, что даже в контроле ФСА микроводорослей находится в угнетённом состоянии. Это может быть связано с антропогенной нагрузкой на эти водные объекты: пруд на р. Мирожке находится в черте г. Пскова, а озёра Тиглицы и Лесицкое – в рекреационных зонах.

Заключение

Исследование фотосинтетических характеристик проб фитопланктона из 9 природных водоёмов Псковской области показало, что весь массив данных можно разделить на две группы, одна из которых характеризуется более высокой, а другая – более низкой фотосинтетической активностью. Сочетание методов машинного обучения с традиционными статистическими методами было использовано для выявления в исследуемом массиве данных неявных закономерностей влияния тяжёлых металлов на фитопланктон. Показано, что в пробах с изначально низкой активностью ФСА токсическое действие тяжёлых металлов

проявляется на более поздних сроках инкубации по сравнению с пробами с изначально высокой активностью ФСА. Предложенный подход к анализу данных может быть легко масштабирован для анализа больших массивов экспериментальных данных, получаемых с помощью автономных станций экологического мониторинга, что делает его перспективным инструментом для раннего обнаружения токсического загрязнения природных вод.

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФ №№ 23-24-00353 и 22-11-00009.

Литература

1. Водка М.В., Полищук А.В., Белявская Н.А., Золотарёва Е.К. Действие тяжёлых металлов на фотосинтетический аппарат и активность карбоангидразы хлоропластов гороха // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2013. № 3 (30). С. 46–55.

2. Гонарчук Е.А., Загоскина Е.В. Тяжёлые металлы: поступление, токсичность и защитные механизмы растений (на примере ионов кадмия) // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2017. № 1 (40). С. 35–49.

3. Розенцвет О.А., Нестеров В.Н., Синютин Н.Ф. Изменения в составе липидов мембран клеток и субклеточных фракций пресноводного растения *Hydrilla verticillata* (L. Fil.) Royle под действием ионов тяжёлых металлов // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2010. Т. 19. № 1. С. 61–77.

4. Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I., Kukaskikh G., Matorin D., Antal T. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (*Pisum sativum* L.) // Planta. 2020. V. 251. Article No. 11.

5. Todorenko D., Volgusheva A., Timofeev N., Kovalenko I., Matorin D., Antal T. Multiple *in vivo* effects of cadmium on photosynthetic electron transport in pea plants // Photochemistry and Photobiology. 2021. V. 97. No. 6. P. 1516–1526.

6. 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. V. 19 / Eds. G.C. Papageorgiou, Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 321–362.

7. Öz M.T., Turan Ö., Kayihan C., Eyidoğan F., Ekmeççi Y., Yücel M., Öktem H.A. Evaluation of photosynthetic performance of wheat cultivars exposed to boron toxicity by the JIP fluorescence test // Photosynthetica. 2014. V. 52. P. 555–563.

8. Heerden P.D.R., Tsimilli-Michael M., Kruger G.H.J., Strasser R.J. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂

assimilation, chlorophyll *a* fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation // Physiologia Plantarum. 2003. V. 117. P. 476–491.

9. Stefanov D., Petkova V., Denev. I.D. Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test // Scientia Horticulturae. 2011. V. 128. P. 1–6.

10. Jiang H.-X., Tang N., Zheng J.-G., Chen L.-S. Antagonistic actions of boron against inhibitory effects of aluminum toxicity on growth, CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of *Citrus grandis* seedlings // BMC Plant Biology. 2009. V. 9. Article No. 102.

11. Swoczyna T., Łata B., Stasiak A., Stefaniak J., Latocha P. JIP-test in assessing sensitivity to nitrogen deficiency in two cultivars of *Actinidia arguta* (Siebold et Zucc.) Planch. ex Miq. // Photosynthetica. 2019. V. 57. No. 2. P. 646–658.

12. 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. V. 14. P. 821–842.

13. Хрущев С.С., Дрозденко Т.В., Плюснина Т.Ю., Тимофеев И.В., Тодоренко Д.А., Тихомирова Е.И., Антал Т.К. Выявление токсического воздействия тяжёлых металлов на фитопланктон с помощью нейросетевого анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 2. С. 134–141.

14. Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components // Journal of Educational Psychology. 1933. V. 24. P. 417–441.

15. van der Maaten L., Hinton G. Visualizing Data using t-SNE // Journal of Machine Learning Research. 2008. V. 9. P. 2579–2605.

16. McInnes L., Healy J. UMAP: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction [Электронный ресурс] <https://arxiv.org/abs/1802.03426> (Дата обращения: 07.04.2023).

References

1. Vodka M.V., Polishchuk A.V., Belyavskaya N.A., Zolotareva E.K. The effect of heavy metals on the photosynthetic apparatus and the activity of carbonic anhydrase in pea chloroplasts // Visnik Kharkivskogo natsionalnogo agrarnogo universitetu. Seriya biologiya. 2013. No. 3 (30). P. 46–55 (in Russian).

2. Gonarchuk E.A., Zagoskina E.V. Heavy metals: intake, toxicity and defense mechanisms of plants (on the example of cadmium ions) // Visnik Kharkivskogo natsionalnogo agrarnogo universitetu. Seriya biologiya. 2017. No. 1 (40). P. 35–49 (in Russian).

3. Rozentsvet O.A., Nesterov V.N., Sinyutina N.F. Changes in the lipid composition of cell membranes and

subcellular fractions of the freshwater plant *Hydrilla verticillata* (L. Fil.) Royle under the influence of heavy metal ions // Samarskaya Luka: problemy regionalnoy i globalnoy ekologii. 2010. V. 19. No. 1. P. 61–77 (in Russian).

4. Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I., Kukarskikh G., Matorin D., Antal T. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (*Pisum sativum* L.) // Planta. 2020. V. 251. Article No. 11. doi: 10.1007/s00425-019-03304-1

5. Todorenko D., Volgusheva A., Timofeev N., Kovalenko I., Matorin D., Antal T. Multiple *in vivo* effects of cadmium on photosynthetic electron transport in pea plants // Photochemistry and Photobiology. 2021. V. 97. No. 6. P. 1516–1526. doi: 10.1111/PHP.13469

6. 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. V. 19 / Eds. G.C. Papageorgiou, Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 321–362. doi: 10.1007/978-1-4020-3218-9_12

7. Öz M.T., Turan Ö., Kayihan C., Eyidoğan F., Ekmekçi Y., Yücel M., Öktem H.A. Evaluation of photosynthetic performance of wheat cultivars exposed to boron toxicity by the JIP fluorescence test // Photosynthetica. 2014. V. 52. P. 555–563. doi: 10.1007/s11099-014-0065-2

8. Heerden P.D.R., Tsimilli-Michael M., Kruger G.H.J., Strasser R.J. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll *a* fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation // Physiologia Plantarum. 2003. V. 117. P. 476–491. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00056.x

9. Stefanov D., Petkova V., Denev. I.D. Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test // Scientia Horticulturae. 2011. V. 128. P. 1–6. doi: 10.1016/j.scienta.2010.12.003

10. Jiang H.-X., Tang N., Zheng J.-G., Chen L.-S. Antagonistic actions of boron against inhibitory effects of aluminum toxicity on growth, CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of *Citrus grandis* seedlings // BMC Plant Biology. 2009. V. 9. Article No. 102. doi: 10.1186/1471-2229-9-102

11. Swoczyna T., Łata B., Stasiak A., Stefaniak J., Latocha P. JIP-test in assessing sensitivity to nitrogen deficiency in two cultivars of *Actinidia arguta* (Siebold et Zucc.) Planch. ex Miq. // Photosynthetica. 2019. V. 57. No. 2. P. 646–658. doi: 10.32615/ps.2019.057

12. Khrushchev S.S., Plyusnina T.Yu., Antal T.K., Pogoryan S.I., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Machine learning methods for assessing photosynthetic activity: environmental monitoring applications // Biophysical Reviews. 2022. V. 14. P. 821–842. doi: 10.1007/s12551-022-00982-2

13. Khrushchev S.S., Drozdenko T.V., Plyusnina T.Yu., Timofeev I.V., Todorenko D.A., Tikhomirova E.I., Antal T.K. Identification of the toxic effects of heavy metals on phytoplankton using neural network analysis of chlorophyll fluorescence induction curves // Theoretical and Applied Ecology. 2021. No. 2. P. 134–141 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2021-2-134-141

14. Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components // Journal of Educational Psychology. 1933. V. 24. P. 417–441. doi: 10.1037/h0071325

15. van der Maaten L., Hinton G. Visualizing data using t-SNE // Journal of Machine Learning Research. 2008. V. 9. P. 2579–2605.

16. McInnes L., Healy J. UMAP: Uniform manifold approximation and projection for dimension reduction [Internet resource] <https://arxiv.org/abs/1802.03426> (Accessed: 07.04.2023). doi: 10.48550/arXiv.1802.03426