

УДК 581.1:582.26

**УЛЬТРАСТРУКТУРА И АВТОТРОФНАЯ ФУНКЦИЯ КЛЕТОК
РАФИДОФИТОВОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *HETEROSIGMA AKASHIWO*
(Y. HADA) Y. HADA EX Y. HARA AND M. SHIHARA, 1987
В ЗАГРЯЗНЕННОЙ МЕДЬЮ СРЕДЕ**

© 2021 г. Ж. В. Маркина*

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2019 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 20.01.2021 г.

Изучено действие меди в концентрациях 10, 25 и 50 мкг/л на рост популяции, физиологическое состояние и ультраструктуру микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). Показано, что медь в большей степени влияет на мембранный потенциал митохондрий, чем на флуоресценцию хлорофилла *a*. Содержание нейтральных липидов в течение опыта в экспериментальных клетках было ниже, чем в контроле. Отмечено, что морфология органелл водоросли не изменялась ни при одной из выбранных концентраций меди, однако при содержании меди 25 и 50 мкг/л в клетках водоросли увеличивалось количество вакуолей.

Ключевые слова: *Heterosigma akashiwo*, загрязнение, медь, митохондрии, флуоресценция хлорофилла *a*, нейтральные липиды, ультраструктура

DOI: 10.31857/S0134347521030074

В последние десятилетия в разных акваториях Мирового океана все чаще отмечают случаи токсичного “цветения”, вызываемого рафидофитовой водорослью *Heterosigma akashiwo* (Heisler et al., 2008; Kempton et al., 2008; Shikata et al., 2008; Dursun et al., 2016). Накапливаясь, токсины приводят к массовой гибели рыб и беспозвоночных (Yu et al., 2010; Mohamed, Al-Shehri, 2012). В связи с этим актуальны исследования, направленные на поиск факторов, которые вызывают массовое размножение данного вида водорослей. На шести клонах *H. akashiwo* разного географического происхождения показано, что соленость и температура – это абиотические факторы, детерминирующие “цветение” водорослей (Martínez et al., 2010). Однако чаще это явление объясняют возрастающим загрязнением окружающей среды. Так, увеличение концентрации нитратов или соединений аммония вызывает “цветение” продуцирующей токсины диатомеи *Pseudo-nitzschia pungens*, фосфатов – синезеленых водорослей и динофлагеллят, а кремния – диатомовых водорослей (Heisler et al., 2008). Для *H. akashiwo* известно, что ее “цветение” обусловлено одновременным увеличением содержания фосфатов и нитратов (Shikata et al., 2008; Dursun et al., 2016).

Среди огромного количества загрязняющих веществ одним из самых изучаемых на протяжении долгого времени остается медь. Это связано с высоким объемом поступления меди в среду: до 90 тыс. т в год (Miazek et al., 2015). В морях России максимальные концентрации меди обнаружены в районах морских портов в Японском море (99 мкг/л), а также в Охотском и Черном морях (50 мкг/л) (Качество..., 2017).

Действие меди на микроводоросли подробно описано в нескольких обзорах (Yruela, 2005; Nagajyoti et al., 2010; Hossain et al., 2012; Miazek et al., 2015). Оценена динамика численности популяции водорослей под воздействием Cu, показано влияние этого металла на фотосинтетический аппарат – основной поставщик энергии для растения (Toncheva-Panova et al., 2006; Perales-Vela et al., 2007; Титов и др., 2011; Sibi et al., 2014; Hamed et al., 2017; Wang et al., 2017). Изменению состояния митохондрий, вызванного присутствием этого элемента, уделено гораздо меньше внимания (Cid et al., 1996). Интенсивное производство микроводорослями нейтральных липидов – одно из последствий стресса, причиной которого является действие тяжелых металлов. Производство липидов и включение их в мета-

болические пути тесно связаны с фотосинтезом, дыханием и другими физиологическими процессами (Соловченко, 2012; Рус et al., 2017).

В практике исследования влияния факторов среды на одноклеточные водоросли все чаще используется проточная цитометрия. Этот метод позволяет определить численность клеток и их размерную структуру, а также оценить физиологическое состояние микроводорослей (Нука et al., 2013). Работы, описывающие ультраструктурные изменения водорослей при воздействии меди, малочисленны, что можно объяснить трудоемкостью данного метода (Chen et al., 2016).

Влияние меди на живые организмы оценивают, как правило, в летальных и сублетальных концентрациях (от 100 мкг/л), что позволяет выявить механизмы действия металла. Однако полученные данные сложно интерпретировать для природных условий. В связи с этим в настоящей работе изучено действие меди в концентрациях 10, 25 и 50 мкг/л на динамику численности, флуоресценцию хлорофилла *a*, мембранный потенциал митохондрий, содержание нейтральных липидов и ультраструктуру микроводоросли *H. akashiwo* (Raphidophyceae).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 (Y. Nada) Y. Nada ex Y. Naga and M. Chihara 1987 (Raphidophyceae), которая была выделена из воды, отобранной в б. Золотой Рог (Японское море). Водоросль выращивали на среде *f*, приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰, в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл при температуре 18°C, интенсивности освещения 70 мкмоль/м²/с в области видимого света и при свето-темновом периоде 14 ч свет : 10 ч темнота (Орлова и др., 2011). В качестве инокулята использовали культуру на экспоненциальной стадии роста. Начальная концентрация клеток микроводоросли во всех опытах составляла 2×10^4 кл/мл; продолжительность экспериментов – 7 сут. Пробы для проточно-цитометрического анализа отбирали через 3 и 7 сут опыта, для ультраструктурного анализа – через 7 сут. Медь добавляли в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; концентрации (10, 25 и 50 мкг/л) указаны в пересчете на ионы меди.

Показатели измеряли на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа записано 10 тыс. событий (регистрируемых в пробе частиц) в течение каждого измерения. Выбор клеток водорослей из общего числа событий, регистрируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* (Нука et al., 2013).

Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм (Нука et al., 2013). Для определения мембранного потенциала митохондрий использовали флуоресцентный краситель DiOC₆(3) (318426-250MG, Sigma-Aldrich) в концентрации 50 нМ. Клетки инкубировали в присутствии красителя в течение 30 мин; длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания – 525 нм (Зурочка и др., 2014). Содержание нейтральных липидов определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red (N3013-100MG, Sigma Aldrich) в концентрации 1 мкг/мл; окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте; длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания – 580 нм (Alemán-Nava et al., 2016).

Для электронно-микроскопического анализа клетки *H. akashiwo* фиксировали в течение 2 ч в 2.5% глутаральдегиде (G5885-10XML, Sigma-Aldrich), приготовленном на какодилатном буфере с pH 7.4 (12300-25, EMS), с дофиксацией 1% четырехокисью осмия (19150, EMS) на этом же буфере в течение 1 ч. Затем материал обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ацетона, после этого заливали в смесь смол Epon-Araldite (13940, EMS) по стандартной методике (Luft, 1961). Срезы толщиной 70 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultracut R LEICA (Австрия), контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца (Reynolds, 1963). Срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Эксперименты проведены в трех повторностях, данные выражены в процентах к контролю (контроль – показатели, полученные для культуры водоросли без добавления меди). Для оценки достоверности полученных различий рассчитывали U-критерий Манна–Уитни. Статистическая обработка выполнена с помощью программы Excel. На графиках представлены средние значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение опыта численность клеток *Heterosigma akashiwo* при концентрации меди 10 мкг/л не отличалась от таковой в контроле. При содержании меди 25 и 50 мкг/л наблюдалось угнетение роста микроводоросли, особенно сильное на седьмые сутки опыта (рис. 1а). Флуоресценция хлорофилла *a* не отличалась от таковой в контроле на третьи сутки опыта, но снижалась на седьмые сутки. Изменения не носили дозозависимого эффекта (рис. 1б). Мембранный потенциал митохондрий на третьи сутки опыта был ниже, чем в контроле, и не восстановился к завершению эксперимента (рис. 1в). Содержание нейтральных

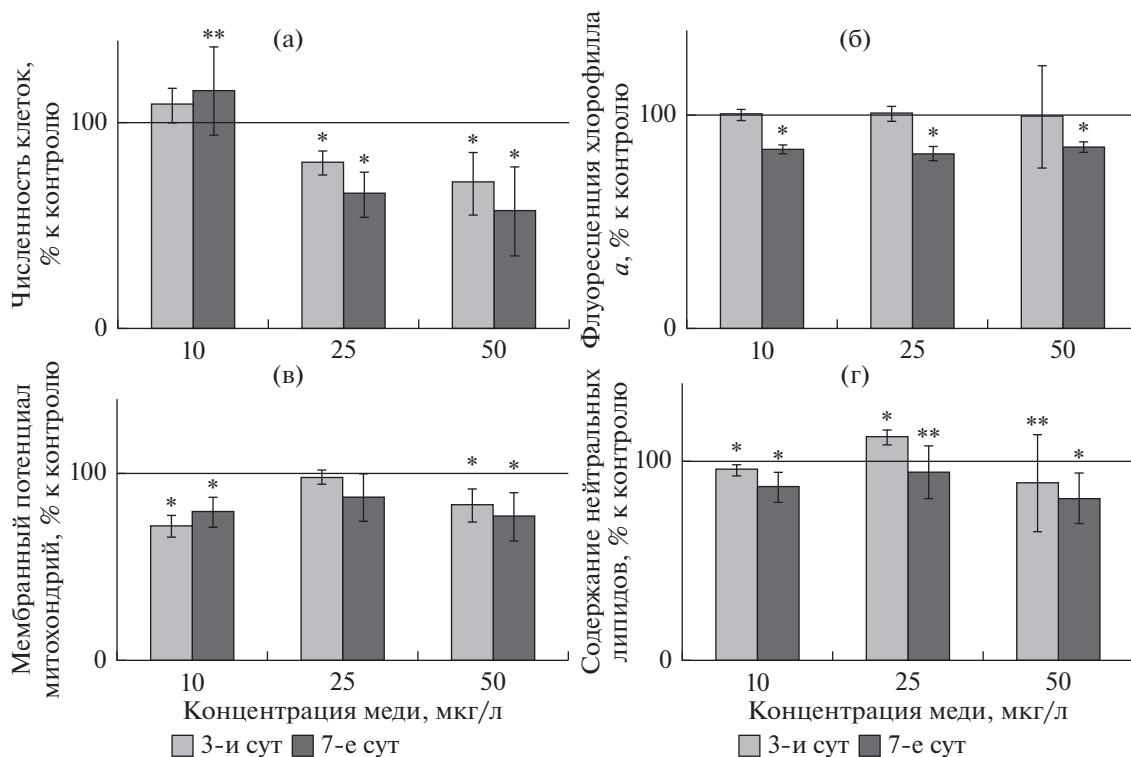


Рис. 1. Рост популяции и физиологическое состояние микроводоросли *Heterosigma akashiwo* при воздействии меди: а – численность клеток; б – флуоресценция хлорофилла *a*; в – мембранный потенциал митохондрий; г – содержание мембранных липидов. *Различия достоверны при $p \leq 0.01$; **различия достоверны при $p \leq 0.05$.

липидов при всех концентрациях меди на седьмые сутки было ниже контрольного (рис. 1г).

В контроле клетки *H. akashiwo* имели вытянутую овальную форму (размер около 10–14 мкм); отмечено множество хлоропластов золотистого цвета, которые располагались пристеночно. Хлоропласты содержали многочисленные ламеллы, каждая из которых состояла из двух тилакоидов. В строме хлоропластов находились пластоглобулы. В центре клетки располагалось округлое ядро диаметром около 4 мкм, рядом находились аппарат Гольджи и митохондрии. Митохондрии клеток *H. akashiwo* имели вытянутую овальную форму; их размер варьировал от 0.5 до 1 мкм (рис. 2а).

При воздействии меди в концентрации 10 мкг/л на клетки *H. akashiwo* изменений на ультраструктурном уровне не выявлено (рис. 2б). При содержании меди в концентрациях 25 и 50 мкг/л также не отмечено значительных изменений фотосинтетического аппарата, митохондрий и других органелл, однако в клетке увеличилось число вакуолей (рис. 2в, 2г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что рост популяции микроводоросли *Heterosigma akashiwo* ингибировался уже при концентрации меди 25 мкг/л.

Известно, что рост зелёной водоросли *Scenedesmus incrassatulus* замедлялся через 6 сут экспозиции при содержании металла 40 и 80 мкг/л (Perales-Vela et al., 2007). Такая же реакция на концентрацию меди 50–100 мкг/л выявлена у диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* (Cid et al., 1996). Снижение численности клеток связано с тем, что медь нарушает многие внутриклеточные процессы, тем самым влияя на рост фотосинтезирующих организмов. В стрессовых условиях организмы используют энергию, предназначенную для роста, на процессы, необходимые для контроля и поддержания клеточного гомеостаза, т.е. для выживания популяции (Perales-Vela et al., 2007).

Основное повреждающее действие меди как результат ее участия в реакциях Фентона и Хабер-Вейса обусловлено продуцированием активных форм кислорода (Hossain et al., 2012; Chen et al., 2016). Известно, что большая часть активных форм кислорода образуется в хлоропластах и митохондриях (Schmitt et al., 2014), поэтому фотосинтетический аппарат и митохондрии наиболее уязвимы к действию факторов среды.

Флуоресценция хлорофилла *a* снижается при нарушении работы фотосинтетического аппарата в результате ингибирования потока электронов, выцветания хлорофилла *a* или уменьшения его

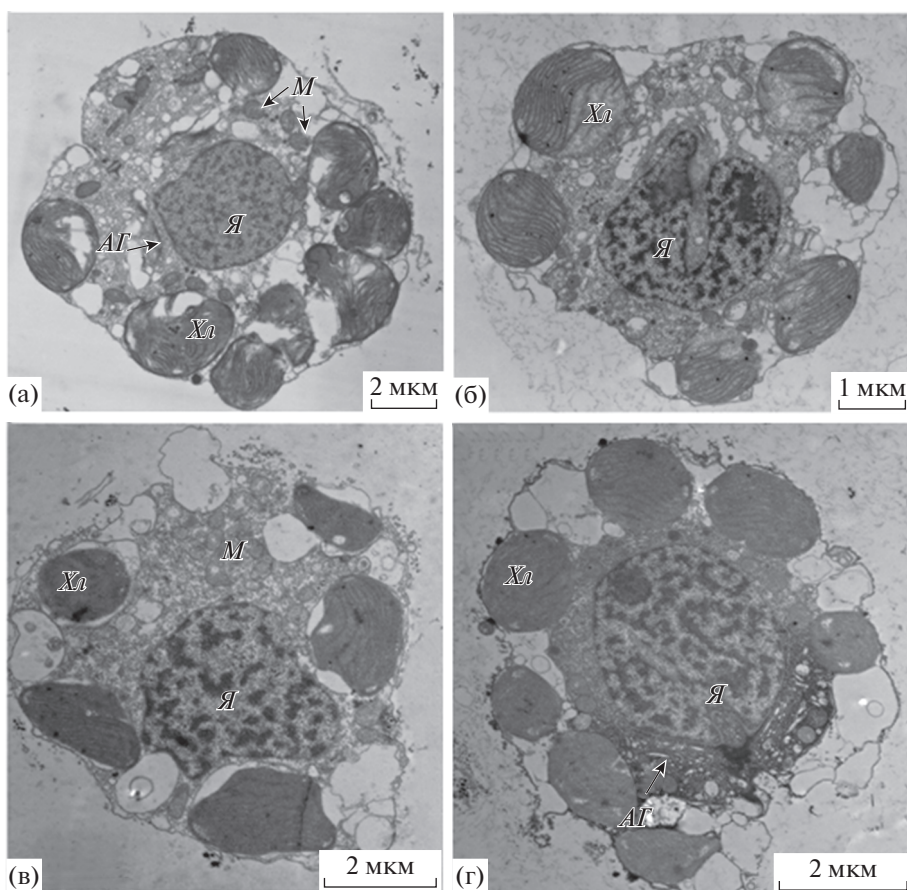


Рис. 2. Ультраструктура клеток *Heterosigma akashiwo* в контроле и при воздействии меди: а – контроль; концентрация меди: б – 10 мкг/л, в – 25 мкг/л, г – 50 мкг/л. Условные обозначения: Я – ядро, М – митохондрии (указаны стрелками), Хл – хлоропласты, АГ – аппарат Гольджи.

концентрации (Cid et al., 1997; Chen et al., 2016; Named et al., 2017; Wang et al., 2017). В нашем эксперименте снижение флуоресценции хлорофилла *a* отмечено на седьмые сутки опыта. Воздействие тяжелых металлов на хлорофилл *a* может быть прямым при непосредственном его разрушении и опосредованным, как следствие нарушения реакций его синтеза и ингибирования ферментов, участвующих в процессе синтеза (Perales-Vela et al., 2007). Медь играет важную роль в электронном транспорте в фотосистемах, и ее избыток приводит к изменению потока электронов в электрон-транспортной цепи. Способность меди заменять магний в молекуле хлорофилла *a* делает пигмент непригодным для фотосинтеза (Miazek et al., 2015; Chen et al., 2016). Сбрасываемая энергия от таких поврежденных хлорофиллов может передаваться молекулярному кислороду, что приводит к появлению синглетного кислорода, вызывающего окислительное повреждение (Nagajoti et al., 2010; Wang et al., 2017), что также является одной из причин снижения флуоресценции хлорофилла *a* и изменения ряда физиологических показателей.

Размер, численность и субклеточное распределение митохондрий могут изменяться в зависимости от физиологических потребностей клеток и факторов среды. У исследованной водоросли на протяжении эксперимента наблюдалось снижение мембранного потенциала, что свидетельствует о деполяризации мембран (Cid et al., 1996). Такое же явление зарегистрировано через трое суток опыта у зеленой водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* при концентрации меди 80 мкг/л (Machado, Soares, 2014) и у диатомеи *Phaeodactylum tricorutum* при содержании меди 100 мкг/л (Cid et al., 1996). При нарушении работы хлоропластов усиливается роль митохондрий в метаболических процессах. Вероятно, это послужило причиной снижения мембранного потенциала митохондрий у *H. akashiwo*. Увеличение нагрузки на митохондрии в условиях загрязнения связано с активацией клеточных процессов, направленных на детоксикацию металла и поддержание клеточной целостности в токсических условиях (Cid et al., 1996; Perales-Vela et al., 2007). Отмечено, что на клеточные мембраны митохондрий медь влияет сильнее, чем другие металлы, присутствующие

даже в бóльших концентрациях (Machado, Soares, 2014).

В стрессовых условиях любой природы в микроводорослях могут накапливаться нейтральные липиды. При концентрациях меди 10–28 мкг/л у видов рода *Chlorella* наблюдали увеличение содержания липидов, однако рост популяций оставался таким же, как и в среде без токсиканта (Sibi et al., 2014; Yang et al., 2015). У *H. akashiwo* при внесении меди в среду, напротив, отмечено уменьшение содержания липидов. Возможно, это связано с видовыми особенностями клеток, так как у представителей рода *Chlorella* даже при благоприятных условиях более высокое содержание липидов, чем у других видов (Yang et al., 2015). Кроме того, снижение содержания нейтральных липидов может быть обусловлено их использованием для компенсации энергозатрат клетки в токсических условиях. На примере другого тяжелого металла кадмия показано, что при повышении его содержания в среде у микроводорослей снижалось количество нейтральных липидов и разрушались липидные тельца (El-Naggar, Sheikh, 2014; Miazek et al., 2015).

Ультраструктура клеток *H. akashiwo* не изменялась по сравнению с таковой в контроле при интоксикации медью в концентрации 10 мкг/л; при более высоком содержании металла отмечено увеличение количества вакуолей в клетке. На увеличение количества и размера вакуолей в присутствии Cu в среде указывали и ранее (Adams et al., 2016; Chen et al., 2016), как и на изменение хлоропластов, накопление крахмальных гранул и утолщение клеточной оболочки (El-Naggar, Sheikh, 2014). Известно, что в условиях стресса вакуоли могут накапливать некоторые соединения, обладающие сильным антиоксидантным действием, и участвовать в выведении тяжелых металлов из клетки (Андреев, 2012). Увеличение числа вакуолей у *H. akashiwo*, вероятно, также является одним из защитных механизмов.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что медь в концентрациях 10–50 мкг/л не вызывает повреждений клетки, однако приводит к нарушению её функционирования. По чувствительности к меди изученные показатели можно расположить в следующем порядке: рост популяции > мембранный потенциал митохондрий > содержание нейтральных липидов > флуоресценция хлорофилла *a* > ультраструктура.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит Мирославу Алексеевну Сабуцкую (ННЦМБ ДВО РАН) за помощь при обсуждении результатов ультраструктурного анализа. Культура микроводоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU_HAK-SR11 предоставлена ресурсным центром “Морской биобанк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>). Проточно-цитометрический анализ выполнен в ННЦМБ ДВО РАН; автор искренне благодарит сотрудников Лаборатории клеточных технологий за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев И.М. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток // Физиол. растений. 2012. Т. 59. С. 660–667.
- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии: 2-е изд. дополненное и расширенное. Екатеринбург: РИО УрО РАН. 2014. 576 с.
- Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2016. М.: Наука. 2017. 190 с.
- Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А., Стоник И.В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов: научно-методическое пособие. Владивосток: Дальнаука. 2011. 89 с.
- Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // Физиол. растений. 2012. Т. 59. С. 192–202.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учеб. пособие. Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН. 2011. 77 с.
- Adams M.S., Dillon C.T., Vogt S. et al. Copper uptake, intracellular localization and speciation in marine microalgae measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence and absorption microspectroscopy // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 8827–8839.
- Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 128. P. 74–79.
- Chen Z., Song S., Wen Y. et al. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 17910–17918. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6997-2>
- Cid A., Fidalgo P., Herrero C., Abalde J. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry // Cytometry. Part A. 1996. V. 25. P. 32–36.
- Cid A., Torres E., Herrero C., Abalde J.E. Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum*

- tricornutum* in short-time exposure assays // Cah. Biol. Mar. 1997. V. 38. P. 201–206.
- Dursun F., Taş S., Koray T. Spring bloom of the raphidophycean *Heterosigma akashiwo* in the Golden Horn Estuary at the northeast of Sea of Marmara // Ege J. Fish. Aquat. Sci. 2016. V. 33. № 3. P. 201–207.
- El-Naggar A.H., Sheikh H.M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals // Life Sci. J. 2014. V. 11. P. 1349–1357.
- Hamed S.M., Selim S., Klöck G., AbdElgawad H. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: growth, oxidative and antioxidants analyses // Ecotoxicol. Envir. Saf. 2017. V. 144. P. 19–25.
- Heisler J., Glibert P.M., Burkholder J.M. et al. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus // Harmful Algae. 2008. V. 8. P. 3–13.
- Hossain M.A., Piyatida P., Teixeira da Silva J. A., Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation // J. Bot. 2012. V. 2012. Art. ID 872875.
<https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Hyka P., Lickova S., Přibyl P. et al. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 2–16.
- Kempton J., Keppler C.J., Lewitus A. et al. A novel *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom extending from a South Carolina bay to offshore waters // Harmful Algae. 2008. V. 7. P. 235–240.
- Luft J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961. V. 9. P. 409–414.
- Machado M.D., Soares E.V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress // Aquat. Toxicol. 2014. V. 147. P. 1–6.
- Martínez R., Orive E., Laza-Martínez A., Seoane S. Growth response of six strains of *Heterosigma akashiwo* to varying temperature, salinity and irradiance conditions // J. Plankton Res. 2010. V. 32. P. 529–538.
- Miazek K., Iwanek W., Remacle C. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial products biosynthesis: a review // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 23929–23969.
- Mohamed Z.A., Al-Shehri A.M. The link between shrimp farm runoff and blooms of toxic *Heterosigma akashiwo* in Red Sea coastal waters // Oceanologia. 2012. V. 54. № 2. P. 287–309.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // Environ. Chem. Lett. 2010. V. 8. P. 199–216.
- Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C. et al. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus in-crassatulus* (Chlorophyceae) // Chemosphere. 2007. V. 67. P. 2274–2281.
- Pyč M., Cai Y., Greer M.S. et al. Turning over a new leaf in lipid droplet biology // Trends Plant Sci. 2017. V. 22. P. 596–609.
- Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208–212.
- Schmitt F.-J., Renger G., Friedrich T. et al. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 835–848.
- Shikata T., Yoshikawa S., Matsubara T. et al. Growth dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Hakata Bay, Japan // Eur. J. Phycol. 2008. V. 43. P. 395–411.
- Sibi G., Anuraag T.S., Bafila G. Copper stress on cellular contents and fatty acid profiles in *Chlorella* species // Online J. Biol. Sci. 2014. V. 14. № 3. P. 209–217.
- Toncheva-Panova T., Merakchiyska M., Djingova R. et al. Effect of Cu²⁺ on the red microalga *Rhodella reticulata* // Gen. Appl. Plant Physiol. 2006. Spec. Iss. P. 53–60.
- Yang J.S., Cao J., Xing G.L., Yuan H.L. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341 // Biore-sour. Technol. 2015. V. 175. P. 537–544.
- Yruela I. Copper in plants // Braz. J. Plant Physiol. 2005. V. 17. P. 145–156.
- Yu J., Yang G., Tian J. The effects of the harmful alga *Heterosigma akashiwo* on cultures of *Schmackeria inopinus* (Copepoda, Calanoida) // J. Sea Res. 2010. V. 64. P. 287–294.
- 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. V. 32. № 2. P. 131–137.

The Cell Ultrastructure and Autotrophic Function of the Raphidophyte Alga *Heterosigma akashiwo* (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara and M. Chihara, 1987 Under Copper Exposure

Zh. V. Markina

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The effects of copper (10, 25 and 50 µg/L) on the population growth, physiological state, and ultrastructure of the microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) were studied. Copper had a greater effect on the mitochondrial membrane potential than on chlorophyll *a* fluorescence. The neutral lipid content was lower in exposed than in control cells throughout the experiment. The morphology of organelles was not altered at any concentration of copper; however, the number of vacuoles in the algal cells increased at 25 and 50 µg Cu/L.

Keywords: *Heterosigma akashiwo*, pollution, copper, mitochondria, chlorophyll *a* fluorescence, neutral lipids, ultrastructure