

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ВОДОРОСЛИ *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

Е.С. Озерова¹, С.В. Константиновская², Ю.Ф. Перов¹,
С.Е. Плеханов¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Воробьевы горы, 119899, Москва, Россия

²Экологический факультет, Российский университет дружбы народов,
Подольское шоссе, д. 8/5, 113093, Москва, Россия

Исследовали электрические свойства целых клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* S-39 в экспоненциальную фазу роста в диапазоне частот от 10^3 до 10^7 Гц. Для частотной зависимости электрических свойств суспензии клеток водоросли установлена β -дисперсия в диапазоне частот 5×10^5 - 10^7 Гц. Полученные результаты адекватно отражают проницаемость внешних клеточных мембран, функциональное состояние, жизнеспособность клеток водоросли и находятся в соответствии с их уровнем фотосинтетической активности. Анализ электрических свойств клеток показал возможность использования полученных данных для оценки физиологического состояния развивающихся культур водоросли

Исследование электрических свойств биологических объектов используется как для оценки структурно-функциональных свойств, так и для изучения их изменений в процессе развития, роста или при действии различных повреждающих факторов. Отличительным преимуществом этого метода является возможность проведения экспериментов без нарушения исходной структуры клеток, высокая информативность и быстрота выполнения измерений.

В основе методов изучения электрических свойств биологических объектов лежит их поведение во внешнем постоянном или переменном электрическом поле, определяемое двумя основными параметрами — активным сопротивлением R (электрической проводимостью G) и емкостью C (дielekтрической проницаемостью ϵ). В переменном электрическом поле эти величины зависят от частоты (проявляют дисперсию), что позволяет получить информацию о проницаемости внешних мембран, состоянии внутриклеточных ионов и уровне метаболизма клетки. На кривой зависимости электрических параметров биологических объектов R и C от частоты электрического поля выделены три основные области, обозначаемые как α -, β - и γ - дисперсии на низких, средних и высоких частотах соответственно (Шван, 1963; Келл, 1992).

При нарушении проницаемости мембран величина сопротивления клетки R начинает снижаться и в меньшей степени зависит от частоты. При полной гибели клетка по своим электрическим параметрам, не отличается от окружающей ее проводящей среды.

Материал и методики. Объектом исследования служила культура зеленой хлорококковой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick. штамм S-39 из коллекции кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова. Аксеничную культуру водоросли выращивали накопительным методом в культуральных сосудах с 250 мл среды Тамия при 37°C при непрерывном двустороннем освещении лампами ЛБ-80 и барботаже воздухом, обогащенным 2% CO_2 . Клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием при 5500 г в течение 15 мин. с последующим фильтрованием через мембранные фильтры SYNPOR № 8 с размерами пор 0,23 мкм («Chemarol», Чехия). Затем плотность упаковки клеток доводили до 0,5-0,7 трехкратным центрифугированием.

Измерение электрических свойств суспензии водорослей по параллельной схеме замещения проводили на установке, позволяющей в диапазоне частот 1 кГц-10 МГц отдельно регистрировать с точностью $\pm 1\%$ активную (R_s) и реактивную (C_s) составляющие импеданса в пределах $10-10^6$ Ом и $10^{-1}-10^6$ пФ, соответственно. Суспензию клеток водоросли в объеме 1,0 мл помещали в стеклянную термостатируемую ячейку с платинированными платиновыми электродами площадью 1 см^2 . Потенциал на электродах ячейки во избежание появления перенапряжения в процессе измерений находился в области равновесного и не превышал 5-10 мВ. Термостатирование ячейки осуществляли при $25\text{ }^\circ\text{C}$ с точностью $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$, калибровку проводили по приготовленному из фиксанала $0,1\text{ N}$ раствору KCl. Влияние ионного состава среды на результаты измерения устраняли путем переноса клеток после первого центрифугирования в эквивалентный раствор холинхлорида.

О функциональном состоянии клеток судили по фотосинтетическим характеристикам культуры, определяя выход переменной флуоресценции хлорофилла с помощью импульсного флуориметра (Лядский и др., 1987) и скорость фотоиндуцированного выделения кислорода клетками электродом закрытого типа. Процессы транспорта электронов блокировали добавками диурона в концентрации $5 \times 10^{-5}\text{ M}$. При определении фотосинтетической активности пробы приводили к оптической плотности 0,2 при 664 нм.

Все опыты проводили не менее чем в трехкратной биологической повторности, на графиках приведены наиболее характерные зависимости.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показали (рис. 1), что наибольшая эффективность функционирования фотосинтетического аппарата клеток водоросли наблюдалась на третьи сутки развития культуры. Этот период характеризуется высокими значениями эффективности работы фотосистемы 2 в клетках водоросли и совпадает с фазой экспоненциального роста по численности клеток, что соответствует ранее полученным результатам (Кажлаева и др., 1991).

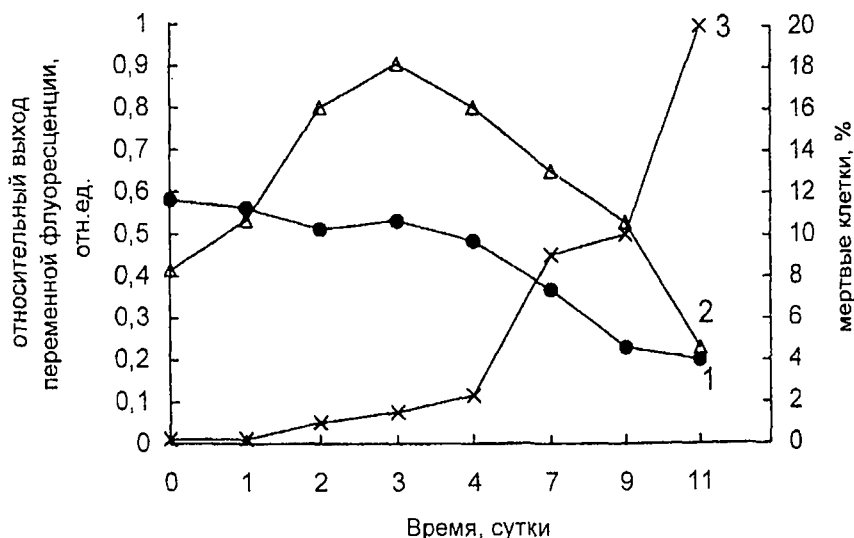


Рис. 1. Изменение фотосинтетических характеристик клеток культуры *Chlorella rupeoidosa*: 1 - относительный выход переменной флуоресценции; 2 - скорость фотоиндуцированного выделения кислорода; 3 - мертвые клетки

Это явилось дополнительным основанием для определения электрических свойств суспензии клеток водоросли в диапазоне частот 1 кГц-10 МГц на третьи сутки культивирования. Измерения, проводившиеся по параллельной схеме замещения, регистрировали сопротивление R_s и емкость C_s суспензии клеток водоросли. На основании полученных результатов рассчитывались величины $tg\delta$, коэффициенты поляризации K_n (отношение R_n на частоте 10 кГц к R_s на частоте 10 МГц) и дисперсии K_d (отношение R_s на частоте 1 МГц к R_s на частоте 5 МГц). Далее, путем перевода из параллельной в последовательную схему замещения, из измеренных величин R_s и C_s рассчитывали численные значения поляризационного сопротивления R_p и определяли зависимости X_p от R_p , представляемые в виде импедансной диаграммы. Для R_s , C_s и $tg\delta$ определяли частотные зависимости этих параметров.

Характерные кривые частотной зависимости электрической проводимости G_s , емкости C_s и $tg\delta$ суспензии клеток водоросли на третьи сутки культивирования приведены на рис. 2, а импедансная диаграмма — на рис. 3.

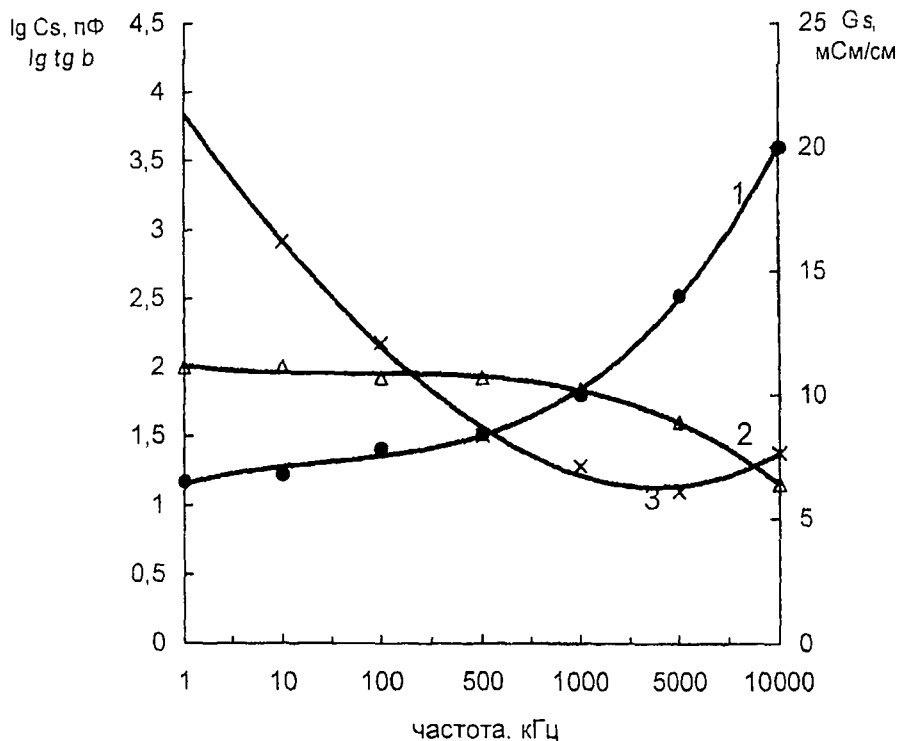


Рис. 2. Электрические свойства клеток *C. pyrenoidosa* в области β -дисперсии на 3-и сутки культивирования для 14-суточной кривой роста: 1- электрическая проводимость, G_s ; 2 - емкость, C_s ; 3 - тангенс угла потерь, $tg \delta$

Анализ кривых зависимости G_s и C_s на низких и высоких частотах показал, что для суспензии клеток водоросли область дисперсии находится в диапазоне частот от 10 кГц до 10 МГц, с максимумом в области 500 кГц-1 МГц, что соответствует положению β -дисперсии. Частотные зависимости величины $tg\delta$ демонстрируют наличие низкочастотного минимума на кривой в области 500 кГц, тогда

как экстраполяция положения максимума свидетельствует о его положении в области более высоких частот — 20-40 МГц (рис.2).

Величины коэффициентов поляризации K_n и дисперсии K_d на 3-и сутки роста накопительной культуры водоросли составляли 5,1 и 1,7, соответственно, что свидетельствует о высоком уровне фотосинтетической активности и жизнеспособности клеток на 3-и сутки культивирования.

Зависимость емкостного сопротивления X_p от поляризационного сопротивления R_p в виде импедансной диаграммы имеет вид полуокружности со смещенным центром, что свидетельствует о наличии процессов избирательной проницаемости наружной мембраны клетки (рис.3). Фазовый угол составляет величину 78° , которая наиболее характерна для большинства интактных клеток (Cole, 1968).

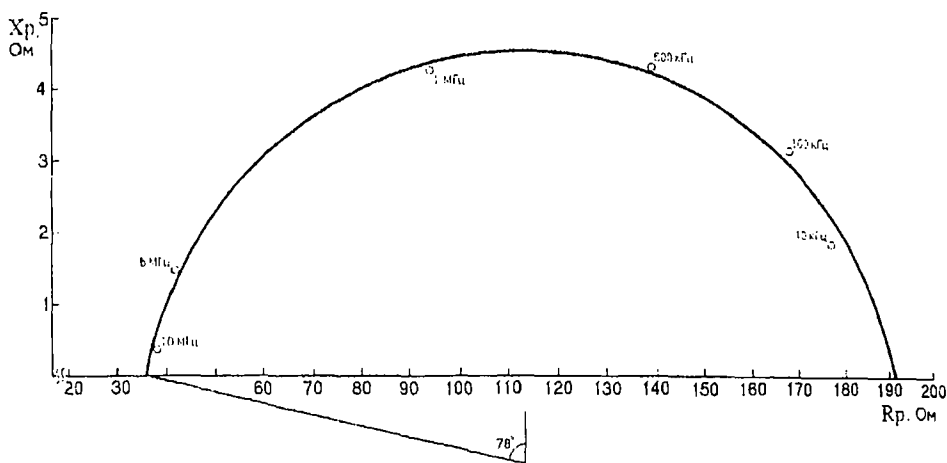


Рис. 3. Импедансная диаграмма Коула-Коула клеток *Chl. pyrenoidosa* на 3-и сутки культивирования для 14-суточной кривой роста

В заключение следует отметить, что полученные результаты дают основания для применения метода измерения электрических свойств в экологическом анализе химических загрязнителей поверхностных вод и в биотехнологии при оценке динамики физиологического состояния микробных (Firstenberg-Eden, 1984) и клеточных популяций (Marx, 1999) в процессе культивирования. Весьма перспективным можно считать создание биосенсора на основе измерения электрических свойств суспензии фотосинтезирующих водорослей, который позволит исследовать действие химических загрязнителей в условиях, наиболее приближенным к естественным.

ЛИТЕРАТУРА

- Шван Г. Спектроскопия биологических веществ в поле переменного тока // Электроника и кибернетика в биологии и медицине. - М.: Изд-во Иностранной литературы, 1963. - С. 71-108.
- Келл Д.Б. Принципы и возможности спектроскопии электрического адмиттанса // Биосенсоры: основы и приложения. - М.: Мир, 1992. - С. 344-374.
- Тарусов Б.Н. Электропроводность как метод определения жизнеспособности тканей // Арх. биол. наук. -1938. Т.52. - Вып. 2. - С. 178-181.
- Cole K.S. Membranes, Ions and Impulses. - Berkely and Los Angeles, Univ. of California Press, 1968.

- Лядский В.В., Горбунов М.Ю., Венедиктов П.С. Импульсный флуориметр для исследования первичных реакций фотосинтеза у зеленых растений. // Научн. докл. Высш. школы. Биол. науки. - 1987. - № 11. - С. 31-36.
- Кажлаева Т.Ф., Плеханов С.Е., Максимова И.В. Зависимость внеклеточной продукции водорослей от функционального состояния их клеток // Биол. науки. - 1991. - № 11. - С. 101-105.
- Firstenberg-Eden R., Eden G. Impedance Microbiology. - Research Studies Press, Letchworth, 1984.
- Marx G.H., Davey C.L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology // *Enz. Microb. Technol.* - 1999. Vol.25. - N. 3-5. - P.161-171.

ELECTRICAL PROPERTIES OF THE SEAWEED CELLS *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

E.S. Ozerova¹, S.V. Konstantinovskaja², Yu.F. Perov¹,
S.E. Plehanov¹

¹*M.V. Lomonosov Moscow State University,
Vorob'ovi gori, 119899, Moscow, Russia*

²*Ecological Faculty, Russian Peoples' Friendship University,
Podolskoye shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia*

Investigated electrical properties of the whole seaweed cells *Chlorella pyrenoidosa* S-39 in a exponential growth phase in a range of frequencies from 10^3 up to 10^7 Hz. For frequency dependence of electric properties of suspension of seaweed cells is established the β -dispersion in a range of frequencies $5 \times 10^5 - 10^7$ Hz. The received results adequately reflect permeability of external cellular membranes, a functional condition, viability of seaweed cells and are according to their level of photosynthetic activity. The analysis of electric properties of cells has shown an opportunity of use of the received data for an estimation of a physiological condition of developing cultures seaweed.