

Введение Присутствие различных форм несвязанной воды в исследуемых образцах меняет как состояние и активность микробиологической системы (МБС) [1], так и методики получения и интерпретации данных ЯМР-релаксо-метрии [2]. Это особенно существенно для исслед-ований микробиологических препаратов, содержа-щих свободную воду в количествах, подавляющих полезный сигнал ЯМР от микроорганизмов (МКО) и связанных с ними молекул воды. Поэтому одним из способов повышения информативности релаксацио-нных методик в исследованиях разбавленных мик-робиологических препаратов является их обезвожи-вание в пределах, при которых эта процедура лишь несущественно искажает структурно-динамическое и функциональное состояние данной МБС. Отсюда возникает необходимость в предварительном анализе характера воздействия физико-механических факторов (центрифугирования и сушки при повышенных темпера-турах), используемых для концентрирования водных сус-пензий, на структурно-динамическое состояние микро-организмов в составе микробиологических препаратов и соответствующие им параметры ЯМР.

Экспериментальная часть Дрожжевой препарат (содержавший 3 грамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (раса 509), используемых в хлебопекарной промышленности, на литр воды) цент-рифугировали при частотах вращения $n_1 = 3000$ и $n_2 = 6000$ об/мин (центрифуга ОПН-8) в течение 5 - 20 минут, после чего удалялась надосадочная жидкость ($\geq 90\%$ первоначального объема). При проведении струк-турно-динамического анализа МБС в качестве опор-ных меток использовали дистиллированная вода и дрожжевая масса (размороженная, но не обезвожен-ная музейная культура дрожжей) [3]. Все релаксационные измерения проводились при комнатных температурах ($23 \pm 20^\circ\text{C}$) на резонанс-ной частоте 19 МГц. Длительность 90о-ного им-пульса в протонном датчике лабораторного ЯМР-релаксометра составляла 3,5 мкс, время парализации (нечувствительности) приема - передающего тракта - 7 мкс. Времена продольной ядерной магнитной релаксации (T_1) находились из инвертированных кривых восстановления намагниченности, представ-ляющих собой огибающие амплитуд, получаемых методом автоматизированной (бегущей) импульс-ной последовательности (БП) $180^\circ - \tau - [90^\circ - 2\tau -]_n$.

Определение времен поперечной релаксации (T_2) осуществлялось из спадов намагниченности, как наблюдаемых после 90о-ного импульса (из спадов свободной индукции (ССИ)), так и построенных в виде огибающих точек, полученных после прохож-дения последовательности Карра-Парселла-Мей-бума-Гилла (КПМГ) [2]. При этом вычисление релаксационных параметров из кривых восстанав-ления продольной или спадов поперечной намагни-ченности (СПН), полученных с помощью мульти-импульсных последовательностей, проводилось по стандартным процедурам в экспоненциальном приближении, а из неэкспоненциальных начальных участков релаксационных спадов или из полностью неэкспоненциальных ССИ - по времени уменьшения амплитуды

сигнала в e раз. Для определения коэффициентов молекулярной диффузии (D) использовалась методика ЯМР ИГМП (ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля) [4] с максимальной амплитудой градиента 0,2 Тл/м. Число накоплений (NS), в зависимости от методики измерения и амплитуды сигнала ЯМР, варьировалось от $NS = 4$ (БП, ИГМП, КПМГ) до $NS = 400$ (ССИ). Задание условий эксперимента и обработка экспериментальных данных (включая накопление сигналов ЯМР) осуществлялись с помощью ЭВМ. Результаты и их обсуждение Из рис. 1а видно, что вследствие низкой концентрации МКО в дрожжевом препарате (ДП) значения релаксационных параметров ДП и водного дистиллята, использованного для его получения, оказались практически одинаковыми ($T_1(\text{ДП}) = 2,50$ с, $T_1(\text{H}_2\text{O}) = 2,51$ с; $T_2(\text{ДП}) = 1,72$ с, $T_2(\text{H}_2\text{O}) = 1,71$ с), но закономерно отличающимися от значений для дрожжевой массы (ДМ): $T_1(\text{ДМ}) = 0,12$ с, $T_2(\text{ДМ}) = 0,036$ с. В то же время диффузионная подвижность молекул H_2O в присутствии малого количества твердофазных частиц (МКО) оказалась выше, чем в их отсутствие ($D(\text{ДП}) = 2,4 \times 10^{-9}$ м²/с, $D(\text{H}_2\text{O}) = 1,5 \times 10^{-9}$ м²/с), и близкой к литературным данным для дрожжей ($D = 2 \times 10^{-9}$ м²/с [5]). Времена продольной ЯМР-релаксации (рис. 1а) пасты (то есть осадка, полученного после центрифугирования дрожжевого препарата) в исследованном диапазоне условий центрифугирования практически не зависят от частоты вращения центрифуги (n) и числа ее оборотов (N), при этом T_1 пасты ($1,1 \pm 0,15$ с) минимум вдвое меньше значений T_1 как дрожжевого препарата до центрифугирования, так и T_1 молекул индивидуальной («свободной») воды ($\sim 2,5$ с). Отмеченные закономерности можно объяснить изменением соотношения компонентов в микробиологической системе (МБС) после удаления из нее надосадочной жидкости, когда содержание твердой (осадочной) фазы (МКО) в образцах возрастает не менее, чем на порядок (от ~ 3 % до 3% вес. и более). С другой стороны, значения T_1 пасты на порядок больше T_1 дрожжевой массы (0,12 с). Поэтому наблюдаемые соотношения между временами продольной релаксации в первом приближении соответствуют быстрому обмену молекулами и(или) протонами [6 - 8] между молекулами воды в свободном состоянии и молекулами, заторможенными в результате взаимодействия с биомассой. Анализ времен поперечной ядерной магнитной релаксации T_2 и коэффициентов молекулярной диффузии D микробиологической системы позволяет получать более детальную информацию о структурно-динамическом поведении компонентов МБС (то есть о характере упаковки и относительных перемещений протоносодержащих структур в областях меньшего, чем в случае T_1 , микроскопического масштаба, но в более широком диапазоне спектра времен (частот) корреляции). При увеличении числа оборотов центрифуги N до 15000 (рис. 1) в пастах выделяются две области: первая, коэффициент диффузии которой (D_2) на порядок меньше D индивидуальных (свободных) молекул воды ($D(\text{H}_2\text{O})$), и вторая область, для которой характерно значение D_1 , в полтора раза

превосходящее значение $D(H_2O)$ и близкое к коэффициенту диффузии исходного ДП. Последнее обстоятельство обусловлено разрушением и(или) перестроением сетки водородных связей, образуемой водной средой суспензии, под воздействием твердоподобных частиц МКО [6 - 8]. Данные о поперечной релаксации (рис. 1) подтверждают возникновение в концентрированном Рис. 1 - Зависимость ЯМР параметров пасты дрожжевого препарата от числа оборотов центрифуги N при различной частоте ее вращения ($n_1 = 3000$ об/мин (), $n_2 = 6000$ об/мин ()) по данным поперечной релаксации () и диффузионной методики (). Значок с более затемненным полем описывает менее подвижную СД фазу. Прерывистые линии соответствуют ЯМР параметрам указанных на рисунке компонентов МБС; а - времена релаксации T_{ji} (левая шкала) и коэффициенты диффузии D_i (правая шкала); б - населенности ЯМР фаз осадке двух неоднородных по молекулярной подвижности структурно-динамических (СД) областей («фаз» [7]). Они описываются не только различными коэффициентами диффузии в них, но и временами релаксации T_{21} и T_{22} (рис. 1а), а также населенностями (рис. 1б) различных компонент СПН (то есть соотношением числа протонов в СД фазах, которое может быть определено по форме как релаксационного (P_{21} и P_{22}), так и диффузионного (P_{d1} , P_{d2}) сигнала [2, 4 - 8]). При этом единое время T_1 можно считать признаком отсутствия макроскопически выделенных фаз (с относительно фиксированной (устойчивой) границей (поверхностью) раздела с линейными размерами $\geq 10^3 \text{ \AA}$ (10^{-7} м)) в системе [6] (что неудивительно для МКО с размерами $\sim 5 \times 10^{-6} \text{ м}$ [1]), а неоднородность параметров поперечной релаксации свидетельствует о формировании различных СД - областей микроскопического масштаба по всему объему образца. Расслоение по релаксационным параметрам наблюдается начиная с $N = 15000$ оборотов, когда значение коэффициента эффективной диффузии в пасте совпадает с величиной $D(H_2O)$, а времена ее поперечной релаксации минимальны. При $N = 30000$ об. значения населенностей, полученных по релаксационной и диффузионной методикам, практически одинаковы ($P_{2i} \approx P_{di}$). Но с ростом интенсивности и времени центрифугирования (n и N) постепенно увеличивается доля заторможенной СД фазы (P_{22} , P_{d2}), и, соответственно, уменьшается количество более мобильных протонов (P_{21} , P_{d1}), причем подвижность протонсодержащих компонентов в обеих фазах непрерывно возрастает ($T_{2i}(N)$, $D_i(N)$). Характерно, что при $N = 30000$ об. значение D_1 для n_1 сравнивается с величиной соответствующего параметра для исходного ДП, не подвергнутого центрифугированию, а молекулярная подвижность той же пасты усредняется по объему (общее (единственное) время T_2). В итоге заторможенная фаза как бы «поглощает» более подвижную фазу, остатки которой, судя по значениям T_{21} при $N \sim 120000$ об., стремятся к плато $T_1(N)$ и величине T_2 для дистиллированной воды. Одновременно параметры заторможенной фазы при $N \sim 120000$ об. приближаются к уровню подвижной

фазы при значениях $N \leq 15000$ об., соответствующих начальному этапу структурно-динамического расслоения МБС. Таким образом, после резкого перераспределения масштаба фаз (P_{2i} , P_{di}) в интервале $15000 \leq N \leq 30000$ и плавного завершения этого процесса при $30000 \leq N \leq 60000$ об., в области $N > 60000$ об. наблюдается явление, аналогичное (но не эквивалентное!) инверсии фаз. По-видимому, на определенной стадии центрифугирования происходит преобразование «фазовой» организации МБС, причем не только структурно-динамической (магнитно-резонансной [6 - 8]), но и в предельном случае - термодинамической. Для дальнейшего анализа этой ситуации обратимся к особенностям поведения функции $T_2(1)(N)$, которая, в отличие от $T_2(N)$, не строго линейно зависит от времени и скорости вращения центрифуги (N и n соответственно). Кроме того, значения населенностей P_{22} растут симбатно N , а начальные значения $T_{21}(N)$, как и времен T_1 , приблизительно соответствуют быстрому протонному обмену между молекулами воды в свободном и связанном с МКО состоянии. Это позволяет объяснить дальнейший рост $T_{2i}(N)$ при увеличении интенсивности (n) и длительности (N) механического воздействия на ДП изменением режима (механизма и(или) масштаба) обменных процессов [5 - 9] между неэквивалентными молекулами H_2O , а не влиянием магнитно-резонансных факторов, например, уменьшением концентрации в выделенных осадках (пастах) парамагнитных примесей (молекул и радикалов кислорода, ионов железа, марганца, и так далее [2, 8, 9]). При этом, как показали исследования интенсивности протонного обмена и зависимости времен T_2 от pH среды [10, 11], подвижность молекул воды зависит от характера (пере)распределения водородных связей, что может быть обусловлено, в том числе, присутствием твердой поверхности МКО и ее особенностями. Кроме того, известно, что разрыв водородных связей ведет к падению T_2 (вследствие уменьшения времени жизни протона в составе H - связи), но несущественно влияет на T_1 и диффузию. Однако с изменением концентрации воды в системе меняются скорости обменных процессов [7 - 9]. Тогда независимость T_1 от параметров (интенсивности и времени) центрифугирования (n и N) в случае преимущественного вклада диполь-дипольного механизма в процесс продольной релаксации может быть связан с конкуренцией различных СД факторов, например, с ростом ширины спектра времен корреляции молекулярной подвижности ($\downarrow T_1$) на фоне падения скорости обменных (межмолекулярных и(или) межпротонных) процессов в системе ($\uparrow T_1$). Кроме того, форма кривых $P_{22}(N)$ при $N \leq 60000$ об. аналогична типичной кривой зависимости веса образовавшегося осадка от времени центрифугирования МБС [3]. В совокупности это позволяет предположить, что по мере центрифугирования происходит ослабление интенсивности обменных процессов, обусловленное нарастанием плотности твердоподобного осадка суспензии и соответствующим снижением поверхности для обменных протонных и(или) молекулярных потоков. Однако

дальнейший ($N > 60000$) рост релаксационных параметров более заторможенной фазы ($T_{22}(N)$, $P_{22}(N)$) не может быть обусловлен только процессами образования и(или) уплотнения осадка, уже проявившим себя на начальном этапе. Известно, что в системах, находящихся в центробежном поле в состоянии равновесия (то есть при $n = \text{const}$), концентрация растворенного вещества увеличивается пропорционально радиусу вращения (расстоянию от оси центрифуги), а градиент концентрации растёт пропорционально $\sim n^2$ [12]. В результате при больших частотах вращения n и малых концентрациях твердофазных компонентов в суспензии большинство твердых частиц достаточно быстро окажутся «размазанными» тонким слоем по значительной поверхности ротора центрифуги, образуя подобие «фильтрующего» слоя, давление на поверхность которого (т.е. на клеточные стенки МКО) способно достигать 10-15 атм. [13, 14]. Тогда наблюдаемые при $N > 60000$ закономерности можно связать не только с явлениями протонного и молекулярного обмена по диффузионному механизму в пределах и между компонентами гетерогенной МБС (что являлось основным СД фактором при $N \leq 60000$), но и с нарастанием в спектре молекулярной подвижности вклада от направленного (конвективного) движения молекул воды через клеточные стенки МКО [15, 16] вплоть до установления определенного уровня подвижного равновесия микро-поток в обоих направлениях. В этом случае следует ожидать постепенного насыщения клеток микроорганизмов избыточной для их физиологии водой (начиная с периплазматического пространства) и роста внутреннего давления (тургора) в замкнутом внутриклеточном пространстве. Отсюда эволюция дрожжевого препарата под воздействием центробежной силы может быть описана как прохождение следующих условных СД интервалов: I - область разгона (формирования осадка) МКО ($0 \leq N \leq 15000$), II - область концентрирования осадка ($15000 \leq N \leq 60000$), III - область набухания МКО ($N > 60000$). На первом этапе происходит разгон консорциума микроорганизмов дрожжевого препарата (то есть диспергирование твердофазной компоненты суспензии и ее концентрирование на поверхности ротора центрифуги), что при $N = 15000$ заканчивается формированием СД фаз двух типов – водных и водосодержащих. Предположительно фазы второго типа представляют собой отдельные мелкодисперсные агломераты (микроконсорциумы) микроорганизмов с молекулами воды, адсорбированными и на внешней, и на внутренней поверхности клеточной стенки (последние формально можно считать абсорбированными в пределах КС), которые через клеточную стенку достаточно быстро взаимодействуют друг с другом и с прото-плазмой клетки, в совокупности образуя менее подвижную ЯМР-фазу (описываемую параметрами T_{22} , P_{22} , D_2 , Pd_2). Одновременно по мере концентрирования осадка в пределах агломератов локализуются молекулы воды, образующие между слоями микроорганизмов подобие подвижного порового пространства (водонаполненные пороподобные прослойки). При этом «поровая» вода

контактирует с формально несвязанными (но по крайней мере стерически ограниченными) молекулами воды (условно «свободной» водой). Отсюда к СД фазам первого типа следует отнести и «поровую», и «свободную» воду, молекулы которых также относительно быстро взаимодействуют друг с другом и в совокупности образуют более подвижную ЯМР-фазу (описываемую параметрами T_{21} , P_{21} , D_1 , ρ_{d1}). Кроме того, фазы обоих типов взаимодействуют (обмениваются молекулами H_2O и(или) протонами в их составе) друг с другом с переменной скоростью, зависящей от параметров центрифугирования ДП. В области разгона соответствующая скорость обмена внутри ассоциированных фаз небольшого размера максимальна, а между ними – минимальна, вследствие чего наблюдаемые времена релаксации также минимальны, а населенности, хотя и не совпадают, но достаточно близки к истинному составу фаз различного типа (P_{21} и P_{22}) [6 - 8]. В области концентрирования осадка ($15000 \leq N \leq 60000$) с ростом интенсивности и времени центрифугирования (N и n) размеры агломератов МКО увеличиваются вследствие уплотнения порового пространства, а поверхность контакта водных и водо-содержащих фаз соответственно сокращается, в результате чего скорость обмена падает как внутри, так и между микрофазами. Это приводит к наблюдаемому росту времен релаксации и сближению значений населенностей («обобществлению») фаз различного типа [6 - 8]. Однако при $N > 60000$ (в области набухания) ситуация качественно меняется: наблюдаются также две, но, исходя из их предистории, более сложные по составу СД фазы. Поскольку процедура измерения проводилась уже после центрифугирования, то дополнительное значительное изменение СД параметров (T_{2i} , P_{2i}), наблюдаемое после завершения процесса нарастания веса (насыщения) осадка ($N \leq 60000$), не может определяться только мгновенным действием центробежной силы, которое прекращается после остановки центрифуги. Оно должно быть связано, как и насыщение осадка, со структурно-динамическими последствиями действия центробежной силы – например, с результатами механического воздействия на поверхность контакта твердой и жидкой фаз. Тогда, для согласования экспериментальных данных, необходимо предположить, что дальнейший рост СД параметров при $N > 60000$ должен быть обусловлен продолжающимся поглощением воды клетками микроорганизма [17], равновесный уровень которого определяется свойствами клеточной стенки и параметрами центрифугирования (n и N), а также геометрическими и гидравлическими характеристиками порово-клеточного канала («трубопровода»), формирующегося под воздействием центробежной силы. Модель центрифугирования дрожжевого препарата Таким образом, феноменологическая картина (модель) центрифугирования выглядит следующим образом. Под первоначальным воздействием центробежных сил не только формируется и уплотняется твердотельный осадок, но и в каждом МКО в составе осадка возникает внутриклеточное давление (тургор), сжимающее

содержимое клетки (прото-пласт) и создающее относительный вакуум у внутренней поверхности клеточной стенки, при одновременном нарастании (симбатно n) внешнего давления на нее со стороны свободных молекул H_2O в суспензии. В результате в интервале $15000 \leq N \leq 60000$ об. создаются условия не только для насыщения осадка, но и для принудительного повышения концентрации воды в МКО за счет освободившегося внутриклеточного пространства. На фоне центробежной силы это приводит к дополнительному росту внутриклеточного давления, что способствует инициации процесса разрушения КС. На заключительном этапе (при $N > 60000$) на фоне продолжающегося набухания происходит дальнейшее разрушение клеточной стенки и образование в ней крупномасштабных дефектов (дыр), что способно со временем привести по крайней мере к частичной потере ее способности выполнять функции структурно-динамического барьера между клеткой и внешней средой. В результате по мере разрушения КС насыщение клеток водой прекращается и иницируется обратный поток, состоящий из внутриклеточной воды и содержащихся в ней различных компонентов прото-пласта (белков, липидов, нуклеиновых кислот, олиго-(поли)сахаридов, и т.д.), которые и образуют разнообразные по подвижности ассоциаты с молекулами поровой, вытекшей внутриклеточной и(или) свободной воды. Именно эти закономерности проявляются и закрепляются в виде роста значений P_{22} и соответствующего падения P_{21} . Полученные результаты могут быть полезны при анализе состояния и функций любых подвергнутых процедуре центрифугирования микробиологических систем [18-20].