



INSTYTUT FIZYKI
UNIwersytet Jagielloński

Piotr Nowak

**Badanie molekularnych
mechanizmów odporności na
przemarzenie i wysuszenie u
krzaczkowatych grzybów
zlichenizowanych**

Praca na stopień doktora nauk biofizycznych
wykonana w Zakładzie Radiospektroskopii Instytutu Fizyki UJ
pod kierunkiem dr hab. Huberta Harańczyka

Kraków 2013

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisany Piotr Nowak (nr indeksu: 1051816), doktorant Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. *Badanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wysuszanie u krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych* jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr hab. Huberta Harańczyka. Pracę napisałem samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadom, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia 17 maja 2013

.....
podpis doktorantki/doktoranta

Kraków, 17 maja 2013 r.

Oświadczenie

Oświadczam, że przedłożone egzemplarze pracy doktorskiej pana magistra Piotra Nowaka pt. *Badanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wysuszanie u krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych* stanowią wersję ostateczną.

dr hab. Hubert Harańczyk

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi dr hab. Hubertowi Harańczykowi za wszechstronną pomoc, zaangażowanie, życzliwość, cierpliwość, okazaną troskę, poświęcony czas i chęć prowadzenia ze mną wnikliwych dyskusji naukowych, pozwalających zrozumieć wiele zjawisk i procesów toczących się w organizmach żywych, co umożliwiło powstanie niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani Prof. dr hab. Marii A. Olech z Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego za dostarczenie próbek plech antarktycznych grzybów zlichenizowanych *Cetraria aculeata* oraz materiałów naukowych.

Pani dr Mai Lisowskiej z Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego dziękuję za oznaczenie żywotności komórek plech oraz wszelką udzieloną pomoc.

Dziękuję także Panu Prof. dr hab. Kazimierzowi Łątce, kierownikowi Zakładu Radiospektroskopii Uniwersytetu Jagiellońskiego, za opiekę naukową podczas studiów III stopnia i tworzenia pracy doktorskiej.

Moje podziękowania pragnę złożyć Panu dr Andrzejowi Waloszkowi z Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego za wykonanie pomiarów fluorymetrycznych aktywności fotosyntetycznej komórek plech oraz pomoc w ich opracowaniu.

Panu Prof. dr hab. Kazimierzowi Strzałce z Zakładu Fizjologii i Biochemii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego serdecznie dziękuję za pomoc w interpretacji wyników pomiarów fluorymetrycznych.

Serdecznie podziękowania składam Pani dr hab. Monice Marzec z Zakładu Inżynierii Nowych Materiałów Uniwersytetu Jagiellońskiego za wykonanie pomiarów kalorymetrycznych plech, a także Jej otwartość, udzieloną pomoc, poświęcony czas i prowadzone dyskusje naukowe.

Dziękuję Panu dr hab. inż. Jackowi Tarasiukowi z Katedry Fizyki Materii Skondensowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie za wykonanie zdjęć plech techniką mikrotomografii komputerowej.

Dziękuję również Panu dr Jackowi Niziołowi z Katedry Fizyki Materii Skondensowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie za pomoc w interpretacji zdjęć mikrotomograficznych.

Serdecznie dziękuję Panu dr hab. Lesławowi B. Lahucie z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za oznaczenie zawartości węglowodanów i wieloalkoholi w plechach.

Bardzo serdecznie dziękuję moim koleżankom i kolegom – doktorantom i pracownikom Zakładu Radiospektroskopii Uniwersytetu Jagiellońskiego – a w szczególności mgr Małgorzacie Florek – Wojciechowskiej za pomoc w wykonaniu części pomiarów transferu magnetyzacji oraz dyskusje naukowe, inż. Tomaszowi Malarzowi za pomoc w obsłudze relaksometru i spektrometru, a także mgr inż. Dorocie Zalitacz za pomoc w redagowaniu niniejszej pracy.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim Rodzicom za cierpliwość i okazane wsparcie podczas powstawania pracy.

Dziękuję także Oskarowi Krzysztoporskiemu za poświęcony czas, pomoc w redagowaniu pracy oraz wszystkie krytyczne uwagi.

Dziękuję Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Radzie Nauki za przyznanie grantu promotorskiego, który umożliwił sfinansowanie części badań, których wyniki znalazły się w niniejszej pracy. Badania te zostały zrealizowane z wykorzystaniem aparatury zakupionej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (projekt POIG.02.01.00-12-023/08).

Spis treści

I. WSTĘP.....10

Wprowadzenie.....10

1. Grzyby zlichenizowane.....13

1.1. Definicja grzybów zlichenizowanych.....13

1.2 Budowa grzybów zlichenizowanych13

1.3. Występowanie grzybów zlichenizowanych.....15

1.4 Znaczenie grzybów zlichenizowanych.....15

1.4.1 Procesy glebotwórcze.....15

1.4.2 Ekologia i ochrona środowiska.....16

1.4.3 Przemysł.....17

1.4.4. Składniki pożywienia.....18

1.5 Mechanizmy przystosowawcze grzybów zlichenizowanych do ekstremalnych warunków środowiska.....18

1.5.1 Odporność na działanie niskich temperatur.....19

1.5.1.1 Unikanie zamarzania.....20

1.5.1.2 Tolerowanie zamarzania.....21

1.5.2 Odporność na wysuszenie i gospodarka wodna.....22

1.5.3 Pobieranie wilgoci z pary wodnej i ze śniegu.....23

1.5.4. Odporność na działanie promieniowania elektromagnetycznego.....24

1.6. Charakterystyka grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* na tle krzaczkowatych.....24

2. Własności wody.....26

2.1. Właściwości fizyczne i chemiczne wody26

2.2. Wiązania chemiczne w molekuły wody27

2.3. Polimorfizm lodu.....	29
2.3.1. Lód heksagonalny (Ih)	29
2.3.2. Pozostałe struktury krystaliczne lodu.....	30
2.4. Lód amorficzny.....	33

II. TEORIA.....34

3. Magnetyczny rezonans jądrowy..... 34

3.1. Izotopy MRJ wykorzystywane w badaniach biofizycznych	34
3.2 Półklasyczny opis MRJ	35
3.2.1 Moment pędu i moment magnetyczny.....	35
3.2.2.Energia oddziaływania momentu magnetycznego z zewnętrznym polem magnetycznym.....	36
3.2.3 Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego.....	37
3.2.3.1. Obsadzenia poziomów energetycznych.....	37
3.2.3.2. Magnetyzacja próbki.....	37
3.2.3.3. Ruch magnetyzacji w stałym polu magnetycznym.....	38
3.2.3.4. Ruch magnetyzacji w stałym i zmiennym polu magnetycznym – rezonans magnetyczny.....	41
3.2.3.5. Procesy relaksacyjne.....	41
3.2.5.6. Relaksacja spin – sieć.....	42
3.2.5.7. Relaksacja spin – spin.....	42
3.3. Kwantowe ujęcie magnetycznego rezonansu jądrowego i procesu relaksacji.....	43
3.3.1 Gęstość spinowa stanów.....	44
3.3.2. Proces relaksacji w układach biologicznych.....	47
3.3.2.1. Hamiltonian układu spinów.....	47
3.3.2.2. Relaksacja na skutek oddziaływania dipolowego i skalarnego.....	49
3.4 Teoretyczne podstawy pomiarów MRJ w domenie czasu i częstości.....	51
3.4.1 Efekt wirującego pola magnetycznego $\vec{B}_1$	51

3.4.2 Sygnał zaniku swobodnej precesji (FID)	51
3.4.2.1 Składowa zaniku swobodnej precesji pochodząca od spinów fazy stałej.....	53
3.4.2.1.1 Model funkcji Gaussa	53
3.4.2.1.2 Model funkcji Abragama.....	54
3.4.2.1.3 Model funkcji Pake'a.....	55
3.4.2.1.4 Precyzyjne wyznaczenie amplitudy sygnału ciała stałego – metoda <i>solid echo</i>	57
3.4.2.2 Sygnał ciekłowy.....	58
3.4.3. Sekwencja Carlla-Purcela-Meibooma-Gilla (CPMG).....	58
3.4.4. Widmo absorpcyjne.....	59
3.4.5. Próbkki mikroheterogenne.....	61
3.4.6. Spektroskopia relaksacyjna.....	62
3.4.7. Transfer magnetyzacji między układami spinów.....	62
3.4.8. Zależność sygnału ^1H -MRJ od poziomu uwodnienia materiału biologicznego.....	63

4. Izoterma sorpcyjna..... 66

4.1 Model Denta	66
4.2 Model BET.....	70
4.3. Model Langmuira.....	71
4.4. Porównanie modeli Langmuira, BET i Denta	71
4.5 Forma paraboliczna izotermy sorpcyjnej i porównanie modeli Denta, BET i Langmuira.....	72

III. METODY BADAŃ.....75

5. Materiały i metody..... 75

5.1. Próbkki.....	75
5.1.1 Oznaczenie żywotności próbek.....	76
5.2. Metody badawcze.....	76

5.2.1. Kinetyka hydratacji i dehydratacji, izoterma sorpcyjna.....	76
5.2.2 Pomiary w MRJ w domenie czasu.....	77
5.2.2.1 Relaksometr.....	77
5.2.2.2. Schemat blokowy relaksometru.....	77
5.2.2.3 Regulator temperatury.....	78
5.2.3 Pomiary w domenie częstotliwości.....	82
5.2.3.1 Spektrometr.....	82
5.2.3.2 Regulacja temperatury.....	83
5.2.4. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC).....	84
5.2.4.1 Skalowanie kalorymetru.....	85
5.2.5 Mikroskopia elektronowa.....	85
5.2.6 Mikrotomografia komputerowa.....	86
5.2.7 Fluorymetria.....	87
5.3 Numeryczne opracowanie danych.....	88
5.3.1 Program CracSpin.....	88
5.3.2 Program Origin 7.0.....	89

IV. WYNIKI.....91

6. Obrazowanie plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*.....91

6.1 Mikroskopia skaningowa plechy grzyba zlichenizowanego	
<i>Cetraria aculeata</i>	91
6.1.1 Powierzchnia plechy.....	91
6.1.2 Wnętrze plechy.....	93
6.1.2.1 Odcinki dolne plechy.....	93
6.1.2.2 Odgałęzienia plechy.....	94
6.1.2.3 Odcinki końcowe.....	96
6.2 Mikrotomografia rentgenowska plechy grzyba zlichenizowanego	
<i>Cetraria aculeata</i>	98

7. Aktywność fotosyntezy PS II plech grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	102
8. Oznaczenie żywotności komórek fotobiontu grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	106
9. Hydratacja plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	108
9.1. Kinetyka dehydratacji plech <i>Cetraria aculeata</i> do fazy gazowej	108
9.2. Kinetyka hydratacji plech <i>Cetraria aculeata</i> z fazy gazowej	109
9.3. Izoterma sorpcyjna	113
9.4. Pomiary relaksacyjne żywych plech <i>Cetraria aculeata</i>	118
9.4.1. Opis sygnału stałego	119
9.4.1.1. Solid echo	119
9.4.1.2. Sygnał składowej stałej w funkcji FID	121
9.4.2. Hydratacyjna zależność sygnału cieczowego	123
9.4.2.1 Częściowe rozpuszczanie frakcji stałej	125
9.5. Pomiary relaksacyjne martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	128
9.5.1. Sygnał pochodzący od protonów matrycy stałej	128
9.5.2. Składowa cieczowa sygnału FID	130
9.6. Spektroskopia ¹ H-MRJ żywych plech <i>Cetraria aculeata</i>	131
9.7. Spektroskopia ¹ H-MRJ martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	135
10. Pomiary temperaturowe plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	139
10.1. Pomiary ¹ H-NMR w domenie częstości	139
10.1.1. Analiza sygnału pochodzącego od protonów frakcji stałej plechy <i>Cetraria aculeata</i>	140
10.1.2. Analiza sygnału pochodzącego od protonów wody związanej w plesze <i>Cetraria aculeata</i>	142

10.1.3 Rozkład pól lokalnych w funkcji temperatury.....	143
10.2. Pomiary plech <i>Cetraria aculeata</i> ¹ H-MRJ w domenie czasu	145
10.2.1 Analiza składowej stałej sygnału zaniku swobodnej precesji.....	146
10.2.2 Temperaturowa zależność składowej cieczowej sygnału FID.....	149

11. Pomiary kalorymetryczne plech *Cetraria aculeata* ... 152

11.1. Szybkość zmian temperatury.....	152
11.2. Zamarzanie i topnienie wody związanej w plesze grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	153
11.3. Hydratacyjna zależność temperatury zamarzania i topnienia wody związanej w plesze <i>Cetraria aculeata</i>	155
11.4. Hydratacyjna zależność zmiany entalpii	156
11.5. Przejście szkliste	157

12. Spektroskopia relaksacyjna i transfer magnetyzacji.....158

12.1. Spektroskopia relaksacyjna.....	158
12.2. Transfer magnetyzacji.....	162

13. Pomiary ²D-MRJ, ¹³C-MRJ, ³¹P-MRJ w domenie częstości.....166

13.1. Widma ² D-MRJ.....	166
13.2. Widma ¹³ C-MRJ	167
13.3. Widmo ³¹ P-MRJ	168

V. DYSKUSJA	170
VI. WNIOSKI.....	177
Literatura.....	181
Spis publikacji autora.....	189
Spis rysunków.....	190
Spis tabel.....	195

I. WSTĘP

Wprowadzenie

Grzyby zlichenizowane, w szczególności zasiedlające tereny antarktyczne, są organizmami zdolnymi do życia w niskiej temperaturze, często poniżej 0°C, oraz w bardzo niskiej wilgotności względnej. Funkcjonowanie w takich warunkach wymaga wykształcenia szeregu mechanizmów pomagających znosić proces głębokiej dehydratacji oraz umożliwiających rehydratację (nawet z fazy gazowej), sterujących procesem tworzenia się kryształitów lodu wewnątrz plechy oraz funkcjonowaniem podstawowych czynności życiowych (metabolizm, fotosynteza). Przypuszcza się, że mechanizmy odporności na zamarzanie i wysuszenie są ze sobą powiązane, bowiem głęboka dehydratacja komórek grzyba zlichenizowanego jest jednym ze sposobów na przetrwanie plech grzybów zlichenizowanych w niskich temperaturach.

Celem badań opisanych w niniejszej pracy była analiza odporności na głębokie wysuszenie i przemarzanie antarktycznych grzybów zlichenizowanych. Na przedmiot badań wybrano krzaczkowaty grzyb zlichenizowany *Cetraria aculeata* (Schreb.) pochodzący z Antarktydy. Krzaczkowate grzyby zlichenizowane są szczególnie narażone na zmiany temperatury (gdyż w przeciwieństwie do listkowatych i skorupiastych grzybów zlichenizowanych ich plecha jest znacząco bardziej eksponowana do otoczenia), ponadto – jak wszystkie organizmy poikilohydryczne – narażone są na drastyczne zmiany wilgotności, gdyż pozbawione są systemu korzeniowego. *Cetraria aculeata*, oprócz Antarktydy, zasiedla również inne środowiska Ziemi (jest organizmem kosmopolitycznym), stwarza to możliwość porównania otrzymanych wyników z wynikami dla plech grzyba zebranego z innych siedlisk niż Antarktyda.

Rozdział pierwszy zawiera krótką charakterystykę grzybów zlichenizowanych, opis odporności na czynniki stresowe: niską wilgotność, niską temperaturę, promieniowanie elektromagnetyczne oraz opis sposobu ich funkcjonowania w tak trudnych warunkach (m.in. analiza prowadzenia gospodarki wodnej). W rozdziale pierwszym przedstawiono także zastosowanie grzybów zlichenizowanych w różnych gałęziach nauk.

Podstawowe informacje na temat wody, kluczowego związku chemicznego dla życia, przedstawiono w rozdziale drugim. Zaprezentowano tam podstawowe własności fizyczne i chemiczne wody, a także omówiono różne typy polimorfów lodu.

Rozdział trzeci stanowi teoretyczne wprowadzenie do głównej techniki pomiarowej wykorzystanej w opisanych badaniach: magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ). Przedstawiono spojrzenie półklasyczne, a także kwantowe na zjawisko MRJ, omówiono procesy relaksacji i ich przyczyny oraz przedstawiono krótkie wprowadzenie do części doświadczalnej. W rozdziale tym znajduje się opis sygnałów zaniku swobodnej precesji (FID) jak i widm protonowych charakterystycznych dla próbek biologicznych, omówiona została także sekwencja CPMG, sekwencja *solid echo*, metoda pomiaru czasu T_1 i metoda badania transferu magnetyzacji.

Podstawowe modele teoretyczne opisujące wiązanie się molekuł wody do powierzchni adsorbenta zostały przedstawione w rozdziale czwartym. Porównano ze sobą trzy modele, zaproponowane przez i) Langmuira, ii) Brunauera, Emmeta i Tellera (model BET) oraz iii) Denta.

Rozdział piąty zawiera opis preparatyki próbek oraz wszystkich metod użytych w prezentowanych badaniach – magnetycznego rezonansu jądrowego, skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC), fluorymetrii, mikroskopii elektronowej i mikrotomografii komputerowej.

Rozdział szósty poświęcono wynikom badania plech *Cetraria aculeata* technikami obrazowania (skaningową mikroskopią elektronową oraz mikrotomografią komputerową). W oparciu o otrzymane obrazy przedyskutowano budowę plechy oraz różnice morfologiczne poszczególnych jej części.

Omówienie wyników badań fluorymetrycznych mających na celu zmierzenie aktywności fotosyntetycznej komórek fotobionta plech *Cetraria aculeata* zamieszczono w rozdziale siódmym.

W rozdziale ósmym omówiono wpływ uwodnienia plech oraz ich mrożenia na przeżywalność komórek fotobionta.

Rozdział dziewiąty stanowi omówienie wyników pomiarów badań hydratacyjnych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*, na które złożyły się: kinetyka dehydratacji, kinetyka hydratacji, konstrukcja izoterm sorpcyjnej, pomiary ^1H -MRJ w zakresie czasu i częstotliwości. W rozdziale dziewiątym omówiono także wyniki badań dotyczących wpływu czynników klimatycznych (a więc wynikającego z nich poziomu fotosyntezy) na proces wiązania wody do matrycy stałej plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*.

W rozdziale dziesiątym przedstawiono wyniki pomiarów temperaturowych ^1H -MRJ w domenie czasu oraz w domenie częstości.

Rozdział jedenasty stanowi omówienie wyników otrzymanych w pomiarach z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej.

Wpływ transferu magnetyzacji między podukładami spinowymi plechy *Cetraria aculeata* na rejestrowane sygnały MRJ został omówiony w rozdziale dwunastym. Rozdział ten zawiera także analizę wyników badań spektroskopii relaksacyjnej.

Rozdział trzynasty stanowi krótkie omówienie zarejestrowanych widm MRJ na deuterze, izotopie węgla ^{13}C oraz fosforu ^{31}P .

Dyskusja wyników oraz wnioski płynące z przeprowadzonych badań zostały przedstawione w ostatnich rozdziałach pracy.

1. Grzyby zlichenizowane

1.1. Definicja grzybów zlichenizowanych

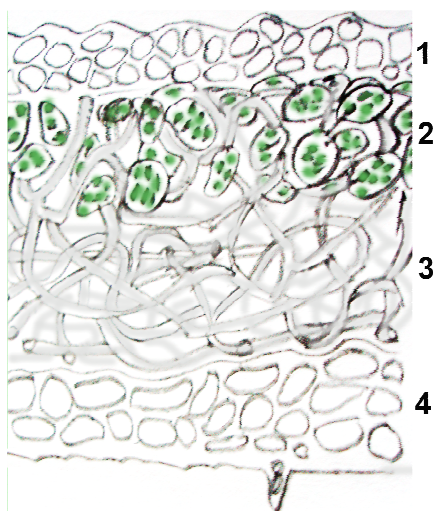
Grzyby zlichenizowane lub lichenizujące (nazywane dawniej porostami), stanowią połączenie dwóch komponentów: glonu (fotobiont) i grzyba (mykobiont), są zaliczane do królestwa grzybów. Proces, w którym powstają – lichenizacja – polega na wchłonięciu przez mykobionta, komórek glonu. Ten ostatni nie jest jednak trawiony, lecz w organizmie grzyba wypełnia miejsca między strzępkami grzybni.

Relacje między komponentami nie są proste do określenia. Niekiedy mówi się o symbiozie, bowiem grzyb ochrania komórki glonu, dostarcza im wody, a także rozpuszczonych w niej składników mineralnych, w zamian otrzymując konieczne do życia produkty fotosyntezy komórek glonu. Każdy z organizmów odnosi korzyści, nie wyrządzając szkody drugiemu. Inni badacze opisują zależność między grzybem a glonem jako helotyzm (relację niewolniczą). Proces fotosyntezy może być pośrednio kontrolowany przez substancje wydzielane przez mykobiont. Bywa także, że grzyb przejmuje całkowitą kontrolę nad glonem, pasożytując na nim [Podbielkowski i in., 1982; Radomski, Jasnowska, 1976].

1.2 Budowa grzybów zlichenizowanych

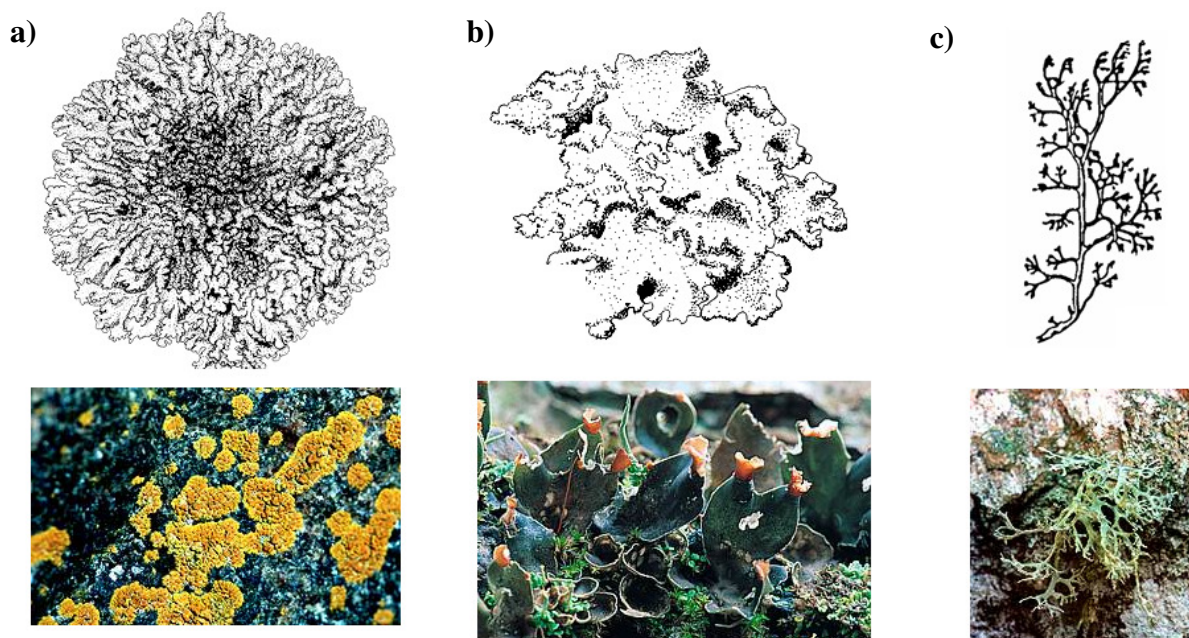
Anatomiczne zróżnicowanie grzybów zlichenizowanych jest niewielkie. Grzyby zlichenizowane mają budowę dwuwarstwową: warstwę korową (zewnątrzną) stanowią ciasno upakowane komórki grzyba, chroniące głębszą część organizmu przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, natomiast wewnętrzną – tworzą luźno ułożone strzępki grzybni, między którymi znajdują się komórki glonu.

W grzybach zlichenizowanych dominuje komponent mykobiontyczny.



Rys. 1.1. Przekrój przez plechę grzyba zlichenizowanego: 1 – część korowa górna, 2 – warstwa gonidialna (skupienie komórek fotobionta), 3 – warstwa rdzeniowa (luźno ułożone strzępki mykobiontu), 4 – warstwa korowa dolna [Liška, 2000].

Ciało grzybów zlichenizowanych (plecha) nie posiada ani korzeni, ani pędów, czy liści, jednak występują znaczne różnice morfologiczne. Ze względu na jej kształt wyróżnia się trzy rodzaje morfologii grzybów zlichenizowanych: skorupiaste, listkowate i krzaczkowate [Tobolewski 1972], natomiast ze względu na rodzaj budującego grzyba: workowcowe (mykobiontem jest workowiec), podstawkowe (podstawczak) i niedoskonałe (grzyb niedoskonały) [Szweykowska, Szweykowski, 2002].



Rys. 1.2. Morfologiczne rodzaje plech grzybów zlichenizowanych: **a)** plecha skorupiasta, zdjęcie - jaskrawiec murowy (*Caloplaca saxicola*), **b)** plecha listkowata, pawężnica drobna (*Peltigera didactyla*), **c)** plecha krzaczkowata, mąkla tarniowa (*Evernia prunastri*) [fot. L. Krzysztofiak, Wigierski Park Narodowy].

Plechy grzybów skorupiastych ściśle przylegają dolną stroną do podłoża. Ich plecha tworzy różnej barwy skorupy i może mieć różną teksturę (np. gładką, ziarenkową). Plechy składające się z kilku płatków (spłaszczeń grzbietowo – brzusznych) przytwierdzonych do podłoża fałdami dolnej strony plechy lub chwytnikami to plechy listkowe. Ostatni typ to grzyby krzaczkowate, w obrębie których można wyróżnić grzyby zlichenizowane o plesze nitkowatej. Ciało krzaczkowatych jest wydłużone i rozgałęzione i przytwierdzone do podłoża jedynie poprzez chwytники znajdujące się w dolnej części. Nitkowate grzyby zlichenizowane mają nierozgałęzioną plechę [Bystrek, 1997].

1.3. Występowanie grzybów zlichenizowanych

Grzyby zlichenizowane to organizmy kosmopolityczne. Dzięki swoim mechanizmom przystosowawczym (Rozdział 1.5) są w stanie przetrwać niemal na każdej szerokości geograficznej. W strefie klimatów równikowych i zwrotnikowych bytują te z nich, które cechują się wysoką odpornością na wysuszenie. Z kolei strefa klimatów okołobiegunowych obfituje w porosty odporne na niską temperaturę.

Grzyby zlichenizowane wygrywają konkurencję z innymi organizmami dzięki zdolnościom do przetrwania w trudnych warunkach środowiska. Są organizmami pionierskimi, zasiedlają podłoża najuboższe, takie jak: powierzchnia i wnętrze skał lub kamieni, kora drzew, jak również obiekty wzniesione przez człowieka – betonowe słupy, rusztowania, mury, budynki.

1.4 Znaczenie grzybów zlichenizowanych

Grzyby zlichenizowane (i) biorą udział w procesach glebotwórczych. (ii) W oparciu o nie tworzy się skała czystości środowiska. (iii) Wykorzystywane są w przemyśle perfumeryjnym i farmaceutycznym, a także w przemyśle chemicznym. (iv) Służą jako pokarm dla zwierząt w strefach klimatów okołobiegunowych.

1.4.1 Procesy glebotwórcze

Grzyby zlichenizowane będąc organizmami pionierskimi jako jedne z pierwszych zasiedlają dziewicze tereny. Obok mchów i drobnoustrojów, biorą one udział w pierwszej

fazie powstawania gleb – procesie inicjalnym. W wyniku ich działania niekorzystne dla innych gatunków podłoża ulegają erozji, i potem stają się dostępne dla bardziej wymagających organizmów.

Grzyby zlichenizowane w warunkach dużej wilgotności są w stanie zaabsorbować wodę, której masa znacznie przekracza ich suchą masę [Kappen i in., 1996; Kappen, 1985]. Rosnąc w lasach klimatów umiarkowanych (składniki ściółki, porostanie pni i konarów drzew) regulują ich gospodarkę wodną. Gdy temperatura wzrasta, a względna wilgotność maleje, woda w nich zmagazynowana może zostać uwolniona do otoczenia.

1.4.2 Ekologia i ochrona środowiska

Wrażliwość na zanieczyszczenia środowiska jest różna dla różnych gatunków grzybów zlichenizowanych. Traktuje się je więc jako bioindykatory. Z uwagi na prowadzenie wymiany gazowej całą powierzchnią ciała grzyby zlichenizowane używane są do wyznaczania czystości powietrza atmosferycznego. Są szczególnie wrażliwe na zanieczyszczenia tlenkami siarki, bowiem wewnątrz plechy reagują one z plynami komórkowymi komponentu glonowego, tworząc kwas siarkowy. Ten, zastępując atom magnezu w cząsteczce chlorofilu dwoma atomami wodoru przekształca go w feofitynę, niezdolną do absorpcji kwantów promieniowania słonecznego, a więc nie mogącą uczestniczyć w fotosyntezie. Konsekwencją tego staje się uszkodzenie fotosystemu II i śmierć organizmu [Hauck, 2007].

Zanieczyszczenie środowiska ocenia się na podstawie analizy rozkładu siedlisk grzybów zlichenizowanych. W oparciu o te informacje została stworzona siedmiostopniowa skala Hawkswortha i Rosea, dla oznaczania czystości powietrza. Każdej z siedmiu stref odpowiada różne stężenie dwutlenku siarki. Strefa I to tak zwana pustynia porostowa, obszar, gdzie brak występowania tych organizmów. Stężenie SO_2 w atmosferze przekracza $170 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Ostatnia, VII strefa wyznaczona jest przez występowanie *Lobaria pulmonaria*, grzyba zlichenizowanego wymagającego bardzo czystego powietrza, stężenie SO_2 na tych obszarach jest mniejsze niż $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [Hawksworth, Rose, 1970].

Grzyby zlichenizowane są czułe na substancje zawarte w powierzchniowej warstwie podłoża. Stosowanie nawozów sztucznych i środków ochrony roślin na szeroką skalę prowadzi do przedostawania się do podłoża toksyn. Jako, że grzyby zlichenizowane nie

posiadają systemu korzeniowego, nie filtrują efektywnie wody, wchłaniając szkodliwe substancje.

Obecnie stwierdza się znaczące tempo zanikania grzybów zlichenizowanych. Wciąż tworzą się kolejne obszary, które można zaliczyć do pustyń porostowych. Przyczynia się do tego emisja zanieczyszczeń przemysłowych do atmosfery, wykorzystywanie szerokiej gamy środków chemicznych w rolnictwie oraz zwiększanie udziału transportu samochodowego (zanieczyszczenia komunikacyjne). Jednak można także zaobserwować obszary, gdzie następuje proces odnawiania, nawet wymagających siedlisk porostowych [Rose, Hawksworth, 1981].

1.4.3 Przemysł

W związku ze zróżnicowaniem ubarwienia i dużym rozpowszechnieniem zlichenizowanych grzybów, były one wykorzystywane jako barwniki do farbowania tkanin. Uzyskiwano z nich szerokie spektrum kolorów, zaczynając od purpurowego aż do różnych odcieni niebieskiego [Szweykowska, Szweykowski, 2002]. Obecnie w większości zostały wyparte one przez syntetyczne substancje, jednak nadal są źródłem niebieskiego barwnika, lakmusu (*Rocella fuciformis*).

Grzyby zlichenizowane od najwcześniejszych czasów, aż po dzień dzisiejszy były używane w przemyśle perfumeryjnym i farmaceutycznym. Już w starożytnym Egipcie *Pseudevernia furfuracea* był wykorzystywany do balsamowania zwłok ze względu na właściwości konserwujące i bakteriobójcze. Tenże gatunek wraz z *Evernia prunastri* od czasów renesansu był wykorzystywany jako składnik mydeł i pachnideł [Studzińska i in. 2008]. Działanie lecznicze grzybów zlichenizowanych odkryto już w czasach starożytnych. Były one używane głównie do leczenia schorzeń górnych i dolnych dróg oddechowych, takich jak zapalenia gardła, krtani tchawicy, oskrzeli, płuc, stany astmatyczne, a także w niewydolności i chorobach układu pokarmowego (żołądek, dwunastnica). W XIX w. używano ich w terapii gruźlicy. Z uwagi na produkowany śluz, po odpowiednim spreparowaniu, mogły służyć jako lek łagodzący podrażnienia oraz być używane jako smarowidła. Obecnie, z racji bogactwa farmaceutyków, nie wykorzystuje się ich na szeroką skalę, ale nadal używane są w medycynie naturalnej i chińskiej. Większe zastosowanie w medycynie konwencjonalnej znalazła *Cetraria islandica* (płucnica islandzka). Oprócz właściwości usuwających wydzieliny zalegającej w drogach oddechowych, substancje w niej występujące uczestniczą w procesie wchłaniania i trawienia pokarmu [Bystrek, 1997].

Grzyby zlichenizowane wykorzystuje się także w przemyśle chemicznym. Posiadają one właściwości grzybo- oraz bakteriobójcze, a także konserwujące. Zawdzięczają te właściwości syntetyzowanym przez nie kwasom porostowym. Są to pochodne fenoli oraz kwasów tłuszczowych. Mają one również własności bakteriostatyczne i toksyczne (np. kwas usninowy, wulpinowy). Kwasy te zostają wydzielane do podłoża i uniemożliwiają innym roślinom, a także grzybom, zasiedlanie terenu, gdzie występuje dany grzyb zlichenizowany. Kwasy porostowe są istotnym elementem mechanizmu przetrwania i konkurencji zlichenizowanych grzybów z innymi formami życia. Udowodniono, iż ani komponent grzybowy, ani glonowy nie jest w stanie samodzielnie zsyntetyzować kwasów porostowych [Studzińska i in., 2008].

1.4.4. Składniki pożywienia

Grzyby zlichenizowane stanowią podstawowy pokarm dla zwierząt żyjących w klimatach okołobiegunowych. Ze względu na bogactwo występowania, są składnikiem diety reniferów hodowanych przez Eskimosów i Lapończyków. Przez ludzi spożywane jest jedynie kilka gatunków, głównie jako przysmak – szczególnie w kuchni japońskiej (*Umbilicaria esculenta*, *Cetraria islandica* [Matwiejuk, 2008]) lub środek pozwalający przetrwać w trudnych warunkach – jak np. *Lecanora esculenta* (krusznica jadalna) spożywana na Bliskim Wschodzie, będąca prawdopodobnie biblijną manną, pożywieniem Narodu Wybranego na terenach pustynnych w drodze z Egiptu do Izraela [Szczepanowicz, 2003].

1.5 Mechanizmy przystosowawcze grzybów zlichenizowanych do ekstremalnych warunków środowiska

Ze względu na zajmowane przez grzyby zlichenizowane tereny, wytworzyły one zdolności umożliwiające im prowadzenie fotosyntezy i metabolizmu w ekstremalnych warunkach. Są nimi: pobieranie wilgoci bezpośrednio z opadów atmosferycznych (śnieg, mgła), prowadzenie fotosyntezy w temperaturze poniżej 0°C oraz odporność na zamarzanie i wysuszenie.

1.5.1 Odporność na działanie niskich temperatur

Wiele gatunków grzybów zlichenizowanych poddawanych powolnemu chłodzeniu znosi temperaturę -196°C [Kappen, 1993]. Natomiast część z nich – w szczególności gatunki antarktyczne - np. *Caloplaca elegans*, *Rhizoplaca melanophthalma* są w stanie przetrwać szybkie schładzanie do tej temperatury. Gatunki europejskie znoszą szybkie chłodzenie do temperatury -78°C , a *Cladonia convoluta* rosnący w regionie śródziemnomorskim do -50°C .

Grzyby zlichenizowane mogą znieść długotrwałe działanie niskich temperatur. Zasuszona *Alctoria ochroleucea* przechowywana przez 3.5 roku w temperaturze -60°C wznowiła czynności życiowe po ponownym uwodnieniu (12 godzin, w temperaturze 6°C). *Cladonia alcicornis* wznowiła aktywność fotosyntetyczną po przetrzymywaniu przez ponad 2 lata w temperaturze -15°C , a następnie ogrzewaniu przez 20 godzin w temperaturze 10°C [Harańczyk, 2003].

O czynnościach życiowych organizmów świadczy poziom prowadzonej fotosyntezy. Wraz ze wzrostem szerokości geograficznej obniża się średnia temperatura powietrza, maleje także temperatura dla maksimum aktywności fotosyntetycznej. Zjawisko to można obserwować nawet dla tych samych gatunków grzybów zlichenizowanych, zasiedlających różne strefy klimatyczne. I tak na przykład *Umbilicaria nylanderiana* rosnący w klimacie śródziemnomorskim najwydajniej przeprowadza fotosyntezę w temperaturze 15°C , natomiast ten sam grzyb zlichenizowany rosnący w strefie okołobiegunowej – w temperaturze 3°C . Wydajność procesu fotosyntezy wyższa jest dla tych grzybów zlichenizowanych, które zasiedlają cieplejsze strefy klimatyczne [Sancho in., 2000].

Poziom aktywności fotosyntetycznej i zakres temperatur, w którym proces ten zachodzi najefektywniej może zmieniać się wraz z porą roku. Dla kanadyjskiego grzyba zlichenizowanego *Cetraria nivalis* (populacja subarktyczna) maksimum konsumpcji CO_2 przypada w sierpniu dla temperatury około 23°C , natomiast w październiku dla temperatury 10°C , z tym, że proces wiązania dwutlenku węgla w październiku jest mniej efektywny [Galun, 1988b].

Antarktyczne grzyby zlichenizowane mogą prowadzić proces fotosyntezy w temperaturach znacznie niższych od 0°C . W warunkach polowych *Umbilicaria aprina* prowadzi fotosyntezę w -17°C [Schroeter i in., 1994], *Usnea sphacelata* w -10°C [Kappen,

1989], *Usnea antarctica* w temperaturze niższej niż -5°C [Schroeter i in., 1995a]. W warunkach laboratoryjnych temperatury te są jeszcze niższe i sięgają nawet -24°C (*Cladonia foliacea*), czy -18°C (*Cladonia convoluta*) [Lange, 1965].

Prowadzenie procesów życiowych w temperaturze poniżej 0°C stwarza groźbę zamarzania płynów ustrojowych. Woda zamarzając przestaje pełnić funkcje niezbędne do funkcjonowania organizmu żywego. Ponadto rosnące krystaliny lodu niszczą błony i struktury komórkowe organizmu.

Udokumentowano dwie strategie obrony przed niszczycielskim działaniem lodu: unikanie zamarzania i tolerowanie zamarzania poprzez stymulację tworzenia się kryształów lodu w przestrzeniach pozakomórkowych.

1.5.1.1 Unikanie zamarzania

Strategia unikania tworzenia krystalitów lodu opiera się na wytworzeniu krioprotektantów. Są nimi wieloalkohole i cukry. Substancje te dobrze mieszają się z wodą, a jednocześnie powodują steryczne niedopasowanie między cząsteczkami wody, co prowadzi do niemożności wzrostu lub nawet utworzenia krystalitu lodu. Obecność alkoholi i sacharydów została potwierdzona w plechach antarktycznych grzybów zlichenizowanych (MRJ na węglu ^{13}C). Stężenie wieloalkoholi wynosiło od kilkunastu do kilkudziesięciu mg na g suchej masy (65 mg/g dla *Usnea antarctica*) i był to głównie arabitol i mannitol (wykrywano także rybitol), natomiast stężenie cukrów wahało się od poniżej 1 mg/g do kilku mg/g suchej masy (7,2 mg/g dla *Pseudephebe minuscula*) i były to głównie glukoza i sacharoza [Chapman i in., 1994].

Jednakże stwierdzone stężenia wielocukrów i alkoholi są zbyt małe, by w znaczący sposób obniżyć temperaturę zamarzania wody zawartej w plesze. Substancje te najprawdopodobniej pełnią jedynie rolę pomocniczą, ale mogą zwiększać odporność na wysuszenie [Graham, Patterson, 1982].

Odporność na zamarzanie obejmuje jeszcze jeden mechanizm unikania zamarzania. Badania MRJ wskazują, że w grzybach zlichenizowanych występują dwa rodzaje (pule) wody: (i) pula wody wiążąca się bezpośrednio do powierzchni plechy - to woda silnie związana, w której molekuły zajmują ściśle określone miejsca, oraz (ii) pula wody, która nie wiąże się bezpośrednio do plechy, lecz do innych, związanych już molekuł wody - to woda luźno związana. Woda ściśle związana nie zamarza, bowiem nie jest możliwe wytworzenie sieci krystalicznej między molekułami, których położenia są wymuszone przez miejsca

wiązania do matrycy stałej grzyba zlichenizowanego. Woda luźno związana jest natomiast podatna na zamarzanie [Harańczyk, 2003]. U niektórych grzybów zlichenizowanych, między innymi w *Cladonia mitis*, wraz z malejącą temperaturą zaobserwowano proces przemiany puli wody luźno związanej w wodę ściśle związaną [Harańczyk, 2003]. Zjawisko to tłumaczy się powstawaniem sieci molekularnej z ciekłych substancji (na kształt żelu), pod wpływem substancji wydzielanych przez grzyb zlichenizowany. Dzięki temu procesowi powiększa się dostępny obszar, do którego może zostać związana woda. Unieruchomione na powierzchni molekuly wody nie zamarzają. Takie przemiany obserwuje się nawet temperaturach powyżej 0°C, zatem wyższych niż temperatury nukleacji. W niższych temperaturach, tworzące się struktury żelowe mogą otaczać powstające kryształki lodu, hamując proces dalszej nukleacji, powodując przerwanie tworzenia krystalitu lodu [Harańczyk i in., 2000].

1.5.1.2 Tolerowanie zamarzania

Inną strategią chroniącą przed skutkami zamarzaniem wody w plesze jest kontrolowane tworzenie krystalitów lodu. Formowanie lodu zachodzi tylko w przestrzeniach pozakomórkowych, co chroni struktury wewnątrzkomórkowe przed uszkodzeniem. Czynnikiem stymulującym kontrolowany wzrost krystalitu są tzw. INA (*Ice Nucleating Agents*) [Harańczyk, 2003]. Uważa się, że INA są białkami, gdyż są stabilne w temperaturach do około 60°C oraz działają dla pH 1,5 – 12, ponadto są dezaktywowane 5M roztworem mocznika w temperaturze powyżej 10°C (działającym jako proteaza), natomiast ich aktywność nie jest znoszona przez chloroform (delipidator). Aktywność INA w tworzeniu krystalitów lodu potwierdzono już w temperaturach około -4°C (*Rhizoplaea chrysoleuca*) [Kieft, Ruscetti, 1990].

Dla *Usnea aurantiaco-atra* wielkość cząsteczek rozpoczynających proces nukleacji miała istotne znaczenie w dalszym procesie tworzenia krystalitów lodu. Cząsteczki o średnicy mniejszej niż 120 µm indukowały zamarzanie w temperaturze -5°C, przy wydajności 75 000 jąder nukleacji na gram w temperaturze -7°C, średnicy 160 µm (przy -7°C) dawały 1400 jąder nukleacji /g, dla jeszcze większych zaś (średnica 240 µm) początek narastania krystalitu miał miejsce dopiero w -8.3°C [Worland i in., 1996].

Grzyby zlichenizowane wykorzystujące tę strategię, charakteryzowały się wyższą temperaturą nukleacji niż graniczna (najniższa) temperatura dla procesu fotosyntezy [Nash i in., 1987]. Na przykład dla *Umbilicaria aprina* temperatura nukleacji wyniosła 5.4°C, podczas gdy za dolną granicę przeprowadzania reakcji fotosyntetycznej przyjmuje się -17°C.

W grzybach zlichenizowanych wykorzystujących powyższy mechanizm ochrony przez zamarzaniem zaobserwowano tworzenie się kryształów lodu poza komórkami glonu, a dodatkowo komórki fotobionta ulegały plazmolizie, pozbywając się wody, która mogłaby zamarznąć. Towarzyszyło temu zapadanie się komórek grzyba. Efekt ten był odwracalny [Schroeter, Scheidegger, 1995b].

1.5.2 Odporność na wysuszenie i gospodarka wodna

Grzyby zlichenizowane są organizmami poikilohydrycznymi, nie mając systemu korzeniowego, dostosowują swój poziom uwodnienia do wilgotności względnej otoczenia. W środowisku suchym ulegają zatem wysuszeniu. Przypuszcza się, że odporność na wysuszenie jest powiązana z odpornością na działanie niskich temperatur, gdyż z tworzeniem pozakomórkowych kryształków lodu związane jest odwodnienie komórek glonu (Rozdział 1.5.1)..

Odporność na drastyczne odwodnienie charakteryzuje wiele gatunków grzybów zlichenizowanych. Półpustynny *Teloschistes lacunosus* fotosyntezuje przy uwodnieniu $\frac{\Delta m}{m_0} = 0.2$ (gdzie m_0 to sucha masa grzyba zlichenizowanego, zaś Δm to masa wody w nim związanej) [del Prado, Sancho, 2000]. Dalsze dehydratowanie plech (poniżej $\frac{\Delta m}{m_0} \approx 0.15$) prowadzi do ustania funkcji życiowych, jednak po ponownym uwodnieniu grzyb zlichenizowany wznawia swoją aktywność metaboliczną.

Grzyby zlichenizowane potrafią uwadniać się do bardzo wysokich poziomów. W przypadku niektórych z nich, przyrost masy może sięgać nawet wielokrotności ich suchej masy, na przykład dla *Umbilicaria spadochroa* wynosi on $\frac{\Delta m}{m_0} = 5.0$, dla *Lasalia pustulata* około $\frac{\Delta m}{m_0} = 4.0$ [Kappen, Schroeter, Hestmark, Winkler, 1996], natomiast dla *Ramalina tereblata* $\frac{\Delta m}{m_0} = 2.63$ [Kappen, 1985]. W przypadku grzybów z rodzaju *Usnea*, były to mniejsze wartości – dla *Usnea sphacelata* 1.60 [Kappen, 1983], a *Usnea fasciata* 1.64 [Kappen, 1985].

Występowanie i wydajność procesu fotosyntezy u grzybów zlichenizowanych zależy nie tylko od temperatury otoczenia, ale także od poziomu wilgotności względnej otoczenia. Maksimum wydajności fotosyntezy – w zależności od gatunku grzyba zlichenizowanego - przypada dla różnych wilgotności względnych powietrza. Wraz ze wzrostem uwodnienia plechy aktywność fotosyntezy rośnie proporcjonalnie do wzrostu $\frac{\Delta m}{m_0}$, jednak dla większych poziomów uwodnień osiąga maksimum, a następnie zaczyna maleć. W przypadku *Usnea sphacelata* oraz *Usnea fasciata* proces fotosyntezy osiąga maksimum wydajności dla $\frac{\Delta m}{m_0} = 0.7$ [Kappen, 1985], natomiast dla *Usnea antarctica* jest to 0.85 [Kappen, Breuer, 1991], wreszcie dla *Umbilicaria decussata* $\frac{\Delta m}{m_0} = 1.0$ [Kappen, 1985].

1.5.3 Pobieranie wilgoci z pary wodnej i śniegu

Grzyby zlichenizowane posiadają zdolność pobierania wody nie tylko z deszczu, ale także z pary wodnej oraz mgły i śniegu.

W strefach polarnych grzyby zlichenizowane rzadko doświadczają temperatur wyższych niż 8°C [Kappen, 1985]. W temperaturze poniżej 0°C jedynym dostępnym źródłem wody jest śnieg lub lód. W takich warunkach grzyby zlichenizowane chłoną wodę obecną w postaci pary wodnej dzięki sublimacji z lodu. Uzyskiwany w ten sposób poziom uwodnienia zależy od gatunku i waha się od $\frac{\Delta m}{m_0} = 0.5 - 1.1$ dla *Usnea sphacelata* [Kappen, Sommerkom, 1995], przez 0.75 – 1.65 dla *Usnea antarctica* [Kappen, Breuer, 1991], aż do $\frac{\Delta m}{m_0} 1.4 - 2.2$ dla *Cetraria nivalis*, [Kappen, Sommerkom, 1995]. Jest to poziom wystarczający do wznowienia procesu fotosyntezy.

Cienka warstwa śniegu (do 4 – 5 cm) jest wystarczająco przepuszczalna dla promieniowania słonecznego, aby znacząco nie utrudniać procesu fotosyntezy. Taka warstwa działa ochraniająco – tworzy „płaszcz” zabezpieczający plechę przed niekorzystnym wpływem mrozu i zimnych wiatrów. Jednak zbyt gruba powłoka śnieżna hamuje lecz odwracalnie fotosyntezę [Kappen, Breuer, 1991].

1.5.4. Odporność na działanie promieniowania elektromagnetycznego

Niektóre grzyby zlichenizowane oprócz odporności na niską temperaturę i wysuszenie są w stanie przetrwać w warunkach próżni kosmicznej wystawione na działanie kosmicznego promieniowania elektromagnetycznego nawet na kilka dni. Plechy trzech gatunków grzybów zlichenizowanych, a mianowicie *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans* i *Aspicilia fructulosa* zostały poddane działaniu pełnego spektrum słonecznego promieniowania elektromagnetycznego oraz temperatury zbliżonej do 0 K przez 10 dni [de la Torre i in., 2010]. Po ponownej hydratacji podjęły czynności życiowe i powróciły do aktywności metabolicznej.

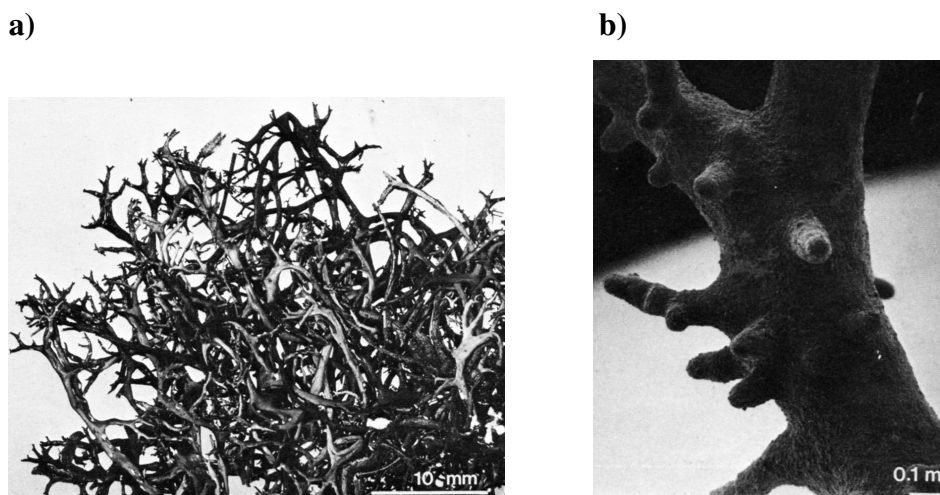
1.6 Charakterystyka grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* na tle innych gatunków o plesze krzaczkowatej

Cetraria aculeata (Schreb.) Fr. to grzyb zlichenizowany zaliczany do krzaczkowatych. Jego plecha jest wydłużona i silnie rozgałęziona. Przylega jedynie niewielką, podstawną częścią do podłoża. Średnia wysokość *Cetraria aculeata* to 1 – 2 cm, jednak zdarzają się okazy osiągające 5 – 6 cm. Inne grzyby zlichenizowane z gatunku *Cetraria* liczą około 6 – 10 cm wysokości, jednakże inne gatunki krzaczkowatych mogą osiągać większe rozmiary. Do największych należą przedstawiciele rodzaju *Usnea* porastające lasy, w których panuje wysoka wilgotność powietrza, osiągając nawet do kilku metrów długości.

Grubość plechy *Cetraria aculeata* wynosi zwykle mniej niż 1 mm, chociaż występują okazy, których grubość jest większa i sięga 4 mm [Kaernefelt, 1986]. Ich plecha ma kształt cylindryczny, a przekrój poprzeczny jest kołem. Zdarzają się również formy spłaszczone, a nawet takie, które przypominają listkowate grzyby zlichenizowane. Niektóre gatunki krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych, szczególnie tych, które osiągają znaczące wysokości, cechuje duża wytrzymałość na naprężenie, wystarczająca dla mechanicznej stabilności plechy. Tkanka zewnętrzna – warstwa korowa – grzyba zlichenizowanego ma za zadanie utrzymać go w odpowiedniej pozycji i zwiększyć jego odporność na uszkodzenia (zgniatanie, zginanie), a włókna wewnętrzne odpowiedzialne są za odporność na rozciąganie [Galun, 1988a]. Rodzaj *Cetraria* posiada rozbudowaną warstwę korową (z licznymi

zgrubieniami) jednak, wskutek małej liczby elastycznych włókien wewnętrznych, jest mało odporny na podłużne naprężenia [Harris, 1901].

Grzyby zlichenizowane z rodzaju *Cetraria* rosną w skupiskach. Dolna, spodnia, część takiego skupiska obumiera, tworząc „szkielet” do rozwoju części górnej. [Galun, 1988a].



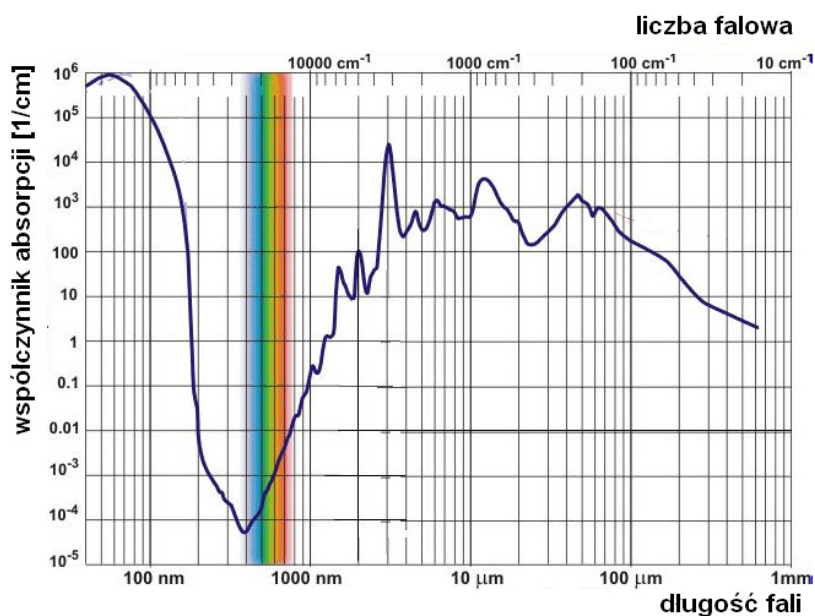
Rys. 1.3. *Cetraria aculeata*: **a)** skupisko grzybów zlichenizowanych, **b)** powiększenie plechy z widocznymi wypustkami [Kaernefelt, 1986].

2. Własności wody

Woda jest najbardziej rozpowszechnioną cieczą w przyrodzie, a także odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych. Jej brak lub niedobór zwykle oznacza śmierć organizmu. Podobnie dzieje się podczas zamarzania płynów tkankowych. Dla przetrwania stresu dehydratacji lub zamarzania niektóre organizmy zdołały wykształcić mechanizmy obronne. Pierwszym krokiem do zrozumienia działania tych mechanizmów jest poznanie właściwości wody.

2.1. Właściwości fizyczne i chemiczne wody

Jedna cząsteczka wody składa się z dwóch atomów wodoru i jednego atomu tlenu. Ma stosunkowo niewielką masę molową (18 g/mol), będąc przy tym niemetalem. W warunkach standardowych dla żywych organizmów (ciśnienie 101325 Pa, temperatura 293.15 K) jest delikatnie niebieskawą cieczą. Wynika to z zależności współczynnika absorpcji od długości fali promieniowania elektromagnetycznego (Rys. 2.1), który dla światła niebieskiego jest najmniejszy z całego zakresu promieniowania widzialnego.



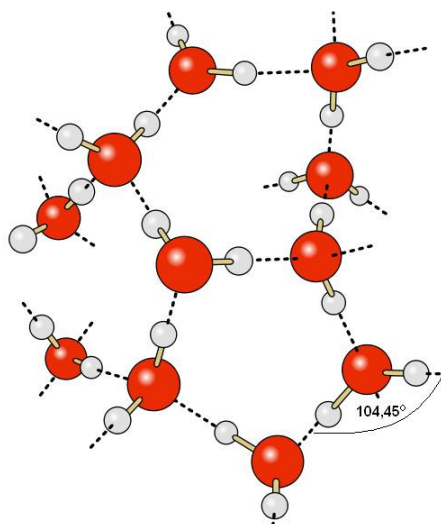
Rys. 2.1. Zależność współczynnika absorpcji promieniowania elektromagnetycznego od długości fali (od 10 nm do 0.6 mm) dla wody. Dane pochodzą z [Warren, 1984, Quickenden, Irvin, 1980, Buiteveld i in., 1994].

Wodę charakteryzuje szereg anomalnych własności w porównaniu do innych substancji o podobnej masie cząsteczkowej [Lehninger, 1979; Lenk, 1986; Stillinger, 1980; Weast, 1974-75]. Wykazuje maksimum gęstości w temperaturze 3.98 °C przy ciśnieniu normalnym, wynoszące 1 g/cm³. Gęstość wody w stałym stanie skupienia jest mniejsza niż gęstość w stanie ciekłym o około 9%. Ponadto wartości temperatur topnienia i wrzenia wody są wysokie (temperatura topnienia wynosi 273.15 K, natomiast wrzenia 373.15 K), a także temperatura krytyczna (374.1⁰C) jest wysoka, jeśli wziąć pod uwagę fakt, że woda nie jest ani substancją metaliczną, ani jonową. Nietypowy jest także przebieg krzywej topnienia, której przebieg jest malejący.

Woda posiada wysokie wartości ciepła topnienia, ciepła parowania oraz wartość ciepła właściwego. Ma wysoką względną przenikalność dielektryczną wynoszącą $\epsilon_r = 80.37$ w 20⁰C. Wodę charakteryzuje także duża wartość napięcia powierzchniowego (od około 60 mN/m dla wody o temperaturach bliskich 100⁰C do około 75 mN/m dla wody o temperaturze około 0⁰C).

2.2 Wiązania chemiczne molekuły wody

W molekule wody występują dwa wiązania O-H, będące wiązaniami kowalencyjnymi spolaryzowanymi. Biorą w nich udział: orbital atomowy tlenu o hybrydyzacji sp^3 oraz orbitale $1s$ atomów wodoru. Energia takiego wiązania wynosi około 420 kJ/mol. Kąt między wiązaniami kowalencyjnymi jest bardzo bliski kątowi czworościennemu i wynosi 104.45⁰. Ponieważ atom tlenu jest atomem silnie elektroujemnym, staje się donorem ładunku dodatniego dla atomu wodoru w molekule – chmura elektronowa z nim związana jest przyciągnięta przez atom tlenu. Skutkiem tego jest powstanie wiązania wodorowego (Rys. 2.2) między tak obdarzonym ładunkiem atomem wodoru (donorem wiązania wodorowego) jednej cząsteczki wody z atomem tlenu drugiej molekuły (akceptorem wiązania wodorowego). Oddziaływanie elektrostatyczne jest najistotniejszym czynnikiem wpływającym na energię wiązania, jednak można wyróżnić jeszcze trzy. Są to przyczynki od oddziaływań: delokalizacyjnych wywołanych dalekozasięgową dystorsją chmur elektronowych, dyspersyjnych, związanych z krótkozasięgowymi ruchami elektronów oraz odpychających związanych z naruszeniem zakazu Pauliego [Rao, 1972].



Rys. 2.2. Molekuły wody w fazie skondensowanej. Kolorem czerwonym oznaczono atom tlenu, kolorem szarym – wodoru. Szara, ciągła linia obrazuje wiązanie kowalencyjne spolaryzowane w obrębie każdej molekuły, natomiast czarna, przerywana linia – wiązanie wodorowe między molekułami.

Wiązanie wodorowe może powstawać nie tylko między atomem wodoru i atomem tlenu, ale także między wodorem oraz innymi atomami elektroujemnymi obecnym w grupach: hydroksylowej, aminowej, tiolowej i innymi silnie elektroujemnymi atomami będącymi akceptorem takiego wiązania: fluorem, chlorem, bromem czy jodem.

Pomysł wiązania wodorowego wyjaśniającego zachowanie wody zaproponowali Latimer i Rodebush w 1920 r. [Latimer, Rodebush, 1920]. Oparli się oni na nowoczesnej wówczas teorii wartościowości. Przyjęli, że atomy wodoru są dwuwartościowe, zatem mogą przyłączać dwie pary elektronów. Jedna para elektronów tworzyła wiązanie kowalencyjne w obrębie cząsteczki, a druga – wodorowe między cząsteczkami. Jednak założenie dwuwartościowości atomu wodoru nie potwierdziło się. W 1957 r. Coulson przedstawił warunki, jakie muszą spełniać atomy X i Y, aby w układzie $X-H\cdots Y$, mogło powstać wiązanie wodorowe [Coulson, 1957]. Atom X, związany z atomem wodoru wiązaniem kowalencyjnym spolaryzowanym musi być silnie elektroujemny. Z kolei atom elektroujemny wiążący się z wodorem wiązaniem wodorowym musi posiadać wolną parę elektronów w niesymetrycznym orbitalu atomowym. Oś tego orbitalu oraz wiązanie kowalencyjne X-H powinny być współliniowe.

Wiązania wodorowe są krótkożyciowe – w temperaturach pokojowych ich średni czas życia jest rzędu dziesiątych części pikosekundy. Wraz z obniżaniem temperatury czas ten wydłuża się do około 1 ps [Chen, Teixeira, 1985].

Energia wiązania wodorowego – 21 kJ/mol [Suresh, Naik, 2000] – jest znacznie mniejsza niż wiązania kowalencyjnego. Mimo to ich obecność ma ogromne znaczenie biologiczne. To właśnie wiązania wodorowe są odpowiedzialne za tworzenie trzeciorzędowej

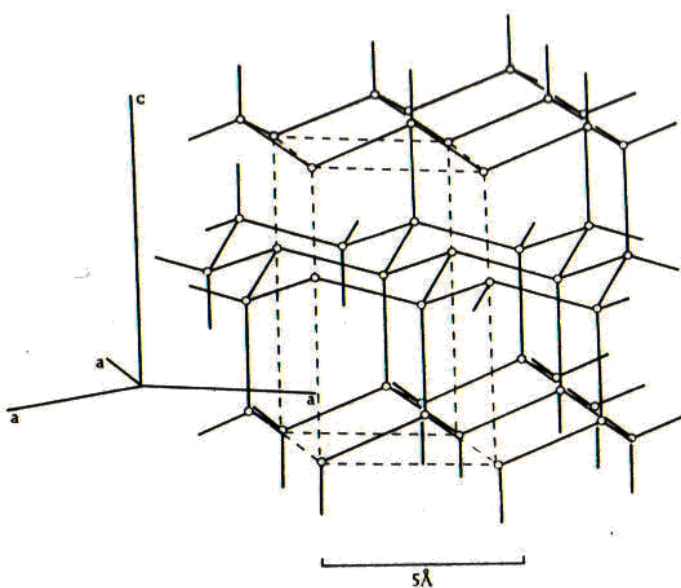
struktury białek oraz kwasów nukleinowych. Wiązania wodorowe wymuszają także określone położenia molekuł w lodzie, powodując, że ma on mniejszą gęstość od wody ciekłej.

2.3 Polimorfizm lodu

Odkryto istnienie piętnastu różnych form krystalicznych lodu w zależności od ciśnienia (a więc i temperatury), w którym krystalizacja wody zachodzi. Ponadto możliwe jest również utworzenie faz amorficznych lodu.

2.3.1. Lód heksagonalny (Ih)

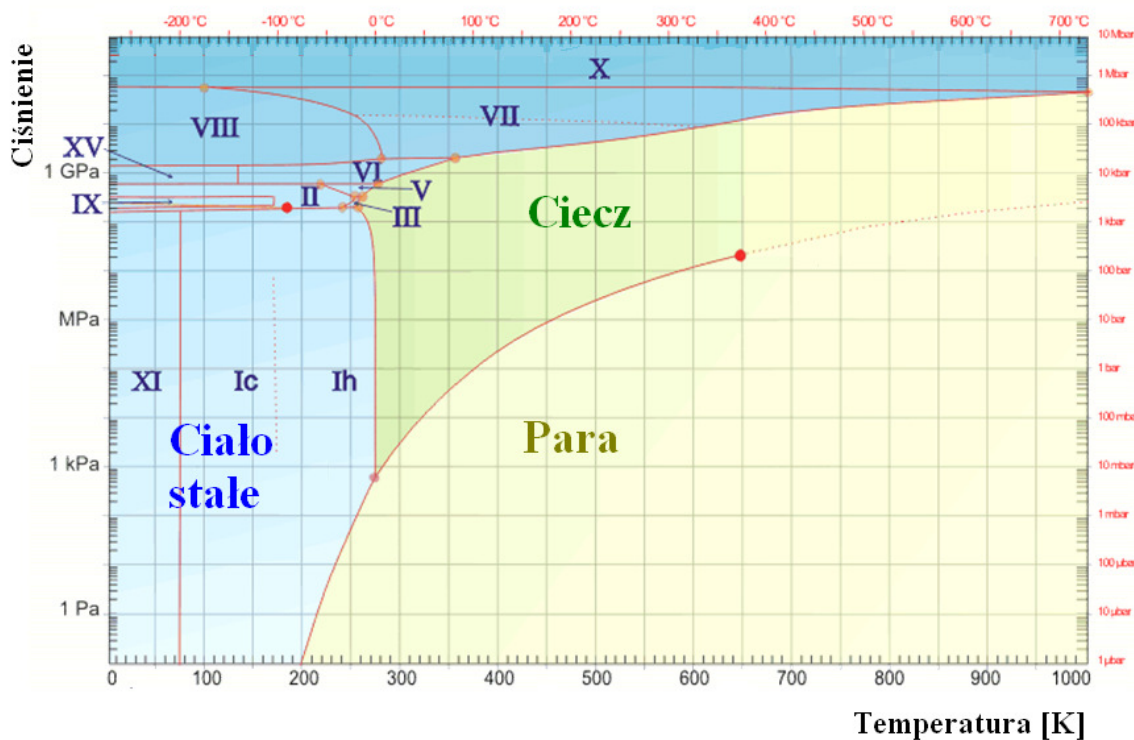
Struktura lodu I jest jedyną trwałą strukturą występującą na Ziemi. W lodzie Ih układ krystalograficzny jest heksagonalny oparty na tetraedrze. Komórka elementarna o symetrii $P6_3/mmc$ zbudowana jest z czterech atomów tlenu umieszczonych w centrum oraz w wierzchołkach tetraedru. Ich rozmieszczenie jest podobne do rozmieszczenia atomów w wircyście i siarczku cynku [Bragg, 1922]. Odległość między sąsiednimi atomami tlenu wynosi $2.76 \text{ \AA}$. Długość wiązania O-H wynosi $1.01 \text{ \AA}$, natomiast kąt między wiązaniami kowalencyjnymi jest taki, jak w przypadku wolnej molekuly. Ułożenie molekuł w lodzie Ih jest tak luźne, że wzdłuż osi a kryształu lodu ciągną się puste kanały, co powoduje, że jego gęstość jest mniejsza od gęstości ciekłej wody [Eisenberg, Kauzmann, 1969].



Rys. 2.3. Lód w fazie Ih (uporządkowanie atomów tlenu, atomy wodoru nie są uporządkowane). Linia przerywaną zaznaczono komórkę elementarną, na którą przypadają cztery atomy tlenu. W strukturze widoczne są kanały ciągnące się wzdłuż kryształu [Owston, 1958].

2.3.2. Pozostałe struktury krystaliczne lodu

Oprócz występującej w przyrodzie fazy lodu Ih, istnieje szereg innych polimorfów lodu. Diagram fazowy przedstawiono na Rys. 2.4, a najważniejsze z tych faz omówiono w tym podrozdziale.



Rys. 2.4. Diagram fazowy dla wody z uwzględnieniem różnych struktur lodu. Został opracowany na podstawie materiałów pochodzących z London South Bank University (<http://www.lsbu.ac.uk/water/phase.html>)

Stabilne polimorfy lodu oznaczane na Rys. 2.4. liczbami rzymskimi od II do XV powstają w ciśnieniach wyższych niż 200 MPa. Jedyną fazą, oprócz lodu heksagonalnego Ih, trwałą w niskich ciśnieniach (<200 MPa) jest lód XI, chociaż większość faz wysokociśnieniowych można zahartować (przenieść do ciśnienia atmosferycznego, pod warunkiem przechowywania ich w temperaturze ciekłego azotu).

Wszystkie krystaliczne polimorfy lodu posiadają uporządkowane atomy tlenu budujące sieć lub sieci krystaliczne. Jednak część faz charakteryzuje się także uporządkowaniem wodorów. Brak uporządkowania wodorów występuje w fazach Ic, III – VII oraz XII. Uporządkowanie atomów wodoru występuje w fazach II, VIII – XI oraz lody XIII, XIV i XV.

Sieć krystaliczna lodu Ic jest kubiczna, powierzchniowo centrowana (grupa symetrii $Fd\bar{3}m$). Odległość między najbliższymi molekułami wody jest identyczna jak w lodzie heksagonalnym (Ih), natomiast odległość między atomami O-H wynosi 0.97 Å – i jest nieco mniejsza niż w lodzie Ih. Podobnie jak lód heksagonalny, lód Ic jest tworzony przez heksagonalne pierścienie w konformacji krzesłowej utworzone z atomów tlenu. Lód kubiczny powstaje poprzez ogrzanie amorficznego lodu szklistego lub przez kondensację pary wodnej na zimnych powierzchniach (o temperaturze około 140 K). Może także powstawać przez ogrzewanie wysokościennej fazy lodu w ciśnieniach niższych niż te, w których powstają [Bertie i in., 1963, 1964; Blackman, Lisgarten, 1958]. Ogrzewanie lodu Ic powoduje jego przejście do lodu Ih [Dowell, 1960]. Faza Ic jest metastabilną fazą lodu w obrębie obszaru występowania fazy Ih.

Analogiem niskotemperaturowym lodu Ih o uporządkowanych atomach wodoru jest **lód XI** Jego komórka elementarna jest romboedryczna (grupa symetrii $Cmc2_1$), a gęstość wynosi 920 kg/m³.

Lód II powstaje z lodu Ih przy ciśnieniu 300 MPa. Komórka elementarna jest romboedryczna i przypada na nią dwanaście molekuł wody. Podobnie jak w przypadku lodu Ih, struktura tworzy pierścienie krzesłowe podobne do struktury cykloheksanu, między którymi znajdują się puste przestrzenie tworzące kanały. Pierścienie przesunięte są względem siebie o kąt 15° oraz bardziej spłaszczone niż dla lodu Ih. Ze względu na miarę kąta między wiązaniami kowalencyjnymi H-O-H wyróżnia się dwa rodzaje molekuł wody: takie dla których kąt ten ma miarę 103.2°, a także 107.6°. Wiązanie wodorowe ma podobną długość jak w lodzie Ih (2.8±0.1 Å) lecz są zgięte o kąt 8°. Średnia gęstość lodu II wynosi 1170 kg/m³ [Kamb, 1964].

Lód III powstaje przy schłodzeniu wody do temperatury 250 K, przy ciśnieniu około 300 MPa. Jego komórka elementarna jest tetragonalna. Przypada na nią dwanaście molekuł wody. W strukturze lodu III znajdują się dwa typy atomów tlenu – budujące helisy i te łączące helisy. Atomy tlenu łączące helisy wiążą się z czterema atomami w czterech różnych helisach każdy [Kamb, Datta, 1960]. **Lód IX** jest niskotemperaturową formą lodu III. Kryształ ma tę samą grupę przestrzenną oraz układ atomów tlenu jak lód III, jednak dodatkowo występuje uporządkowanie protonowe. Podczas ogrzewania przechodzi w fazę lodu II.

Lód V powstaje z wody ciekłej przy ciśnieniu 500 MPa, w temperaturze 253 K. Komórka elementarna lodu V jest jednoskośna (grupa przestrzenna $C2/c$) i zawiera 28 molekuł wody [Kamb i in., 1967]. W lodzie V można wyróżnić cztery typy atomów tlenu. Molekuły wody zawierające dwa z nich (nazywane O₂ i O₃) oraz molekuły zawierające trzeci

typ atomów tlenu (atomy O_4) tworzą dwa łańcuchy połączone ze sobą. Dodatkowo różne łańcuchy zbudowane z molekuł zawierających atomy O_2 i O_3 połączone są ze sobą molekułami zawierającymi kolejny typ atomów tlenu (O_1). Gęstość lodu V wynosi około 1240 kg/m^3 . **Lód XIII** jest niskotemperaturowym analogiem lodu V z uporządkowanymi atomami wodoru. **Lód IV** jest metastabilną fazą lodu V. Jego struktura nie jest jeszcze dobrze poznana. Tworzy się przy powolnym ogrzewaniu (0.4 K/min) amorficznej formy lodu, począwszy od 145 K przy ciśnieniu 810 MPa [Salzmann i in., 2003a]. Jego komórka elementarna jest romboedryczna (grupa przestrzenna $R\bar{3}c$).

Lód VI powstaje z wody ciekłej w temperaturze 270 K pod ciśnieniem 1.1 GPa . Jego komórka elementarna jest tetragonalna (grupa przestrzenna $P4_2/nmc$) i zawiera 10 molekuł. Każda z molekuł wody jest związana wiązaniami wodorowymi z czterema najbliższymi cząsteczkami wody. Odległość między najbliższymi położonymi atomami tlenu wynosi 2.81 Å . Występują dwa rodzaje cząsteczek wody ze względu na kąt między wiązaniami kowalencyjnymi, który ma miarę 76° lub 128° . Jest to lód dwusieczowy, jednak poszczególne sieci nie łączą się ze sobą wiązaniami wodorowymi. Jego gęstość wynosi 1310 kg/m^3 . Jego niskotemperaturowym odpowiednikiem z uporządkowaniem protonowym jest **lód XV**.

Lód VII jest lodem dwusieczowym. Powstaje przy ciśnieniach około 3 GPa . Ma strukturę kubiczną ($Pn\bar{3}m$) złożoną z dwóch sieci lodu Ic. Gęstość lodu VII wynosi 1650 kg/m^3 . Każdy atom tlenu sąsiaduje z ośmioma innymi atomami tlenu, jednak połączony wiązaniem wodorowym jest tylko z czterema innymi molekułami wody. **Lód VIII** jest niskotemperaturowym analogiem lodu VII. Jego gęstość wynosi 1660 kg/m^3 (przy ciśnieniu 2.5 GPa). Podobnie jak lód VII jest złożeniem dwóch sieci lodu Ic. Zwiększenie ciśnienia powyżej 60 GPa przekształca lód VII w **lód X**. Podobnie jak lód VII, lód X jest fazą dwusieczową. Kryształ lodu X, ma grupę przestrzenną $Pn\bar{3}m$. Każdy atom tlenu ma ośmiu najbliższych sąsiadów znajdujących się w odległości 2.78 Å . Forma ta cechuje się również uporządkowaniem protonowym – każdy atom wodoru posiada dwunastu najbliższych sąsiadów.

Lód XII powstaje w wyniku ogrzewania lodu amorficznego od temperatury 77 K do 183 K pod ciśnieniem 810 MPa z szybkością większą niż 15 K/min , a następnie powtórne schładzania do temperatury 77 K pod ciśnieniem atmosferycznym [Salzmann i in., 2003b]. Tworzy tetragonalną sieć krystaliczną o grupie symetrii $I\bar{4}2d$. Każda molekula wody związana jest z pięcioma innymi. Na komórkę elementarną składa się dwanaście cząsteczek

wody [Koza i in., 1999]. Gęstość lodu XII wynosi około 1300 kg/m^3 . **Lód XIV** jest analogiem fazy lodu XII o uporządkowanych atomach wodoru.

2.4. Lód amorficzny

Woda może tworzyć fazy szkliste o gęstości 1170 kg/m^3 (tzw. *High Density Amorphous Ice*) lub około 940 kg/m^3 (*Low Density Amorphous Ice*). HDA może powstać ze struktury lodu Ih, Ic lub XI poprzez zwiększenie ciśnienia do około 1 GPa w niskiej temperaturze (postać jest stabilna w temperaturze 77 K) [Loerting, Giovambattista, 2006]. Ogrzanie HDA do temperatury powyżej 120 K powoduje przekształcenie tej formy w LDA. Ponowne obniżenie temperatury do 77 K nie powoduje przekształcenia formy LDA w formę o wyższej gęstości. Ogrzanie LDA do temperatury rzędu 150-160 K przekształca ją w kubiczną fazę krystaliczną, ale jej struktura nie została jeszcze dobrze poznana [Urquidi i in., 2004].

Podjezuwa się także istnienie amorficznej fazy lodu o gęstości przekraczających 1250 kg/m^3 (*Very High Density Amorphous Ice*). Pierwsze wzmianki o tej fazie pojawiły się w 2001 r. [Loerting i in., 2001]. Powstaje ona przy izobarycznym ogrzewaniu HDA od temperatury 77 K do 160 K przy ciśnieniu 1.15 GPa.

II. TEORIA

3. Magnetyczny rezonans jądrowy

Metoda magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) wykorzystuje oddziaływanie jąder o niezerowym spinie ze stałym i ze zmiennym zewnętrznym polem magnetycznym. Na podstawie szybkości procesów relaksacyjnych odbywających się w stałym polu magnetycznym na skutek pobudzenia układu spinów impulsem pola zmiennego, można wnioskować o dynamice układu spinów jądrowych. Jako, że woda jest głównym składnikiem organizmów żywych, protonowy rezonans magnetyczny może posłużyć do wyznaczania poziomu uwodnienia badanych układów biologicznych, a także fazę i ruchliwość zawartej w nich wody.

3.1. Izotopy MRJ wykorzystywane w badaniach biofizycznych

Do nuklidów mających szczególne znaczenie dla badania układów biologicznych należą

- (i) ^1H , prot;
- (ii) ^2D , deuter, izotop wodoru, dzięki niewielkiej naturalnej abundancji, (0.015%), znajduje zastosowanie jako podstawnik ^1H w obrazowaniu konkretnych grup;
- (iii) ^{13}C , izotop węgla występujący z związkach budujących wszystkie organizmy żywe, jego abundancja wynosi około 1.1%;
- (iv) ^{31}P , jedyny izotop fosforu, jego związki budują błony komórkowe, co umożliwia badanie ich dynamiki i określenia struktury ciekłokrystalicznej oraz cząsteczki ATP, biorące udział w reakcjach metabolicznych.

Również ^{19}F , ^{17}O czy ^{23}Na są wykorzystywane w badaniach biologicznych.

3.2 Półklasyczny opis MRJ

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego jest zjawiskiem kwantowym, dotyczy momentów magnetycznych jąder atomowych, związanych z ich spinami. W przypadku makroskopowych próbek, w których znajduje się wiele jąder atomowych, wygodniej jest opisywać to zjawisko w sposób półklasyczny – w oparciu o zachowanie się wypadkowego momentu magnetycznego całej próbki.

3.2.1 Moment pędu i moment magnetyczny

Moment pędu $\vec{K}$ danego obiektu względem określonej osi jest iloczynem wektorowym jego wektora wodzącego $\vec{r}$ i pędu $\vec{p}$:

$$\vec{K} = \vec{r} \times \vec{p}. \quad (3.1)$$

Jeśli ciało posiada moment magnetyczny $\vec{\mu}$, umieszczeniu go w polu magnetycznym o indukcji $\vec{B}_0$ działa na niego moment siły $\vec{M}_s$, taki że:

$$\vec{M}_s = \vec{\mu} \times \vec{B}_0. \quad (3.2)$$

Moment magnetyczny towarzyszy poruszającym się ładunkom elektrycznym. Jest związany z momentem pędu, $\vec{K}$, zależnością, :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{K}, \quad (3.3)$$

gdzie γ to czynnik żyromagnetyczny.

Wszystkie jądra atomowe, które składają się z nieparzystej liczby protonów lub nieparzystej liczby neutronów, posiadają niezerowy spin jądrowy, oraz niezerowy moment magnetyczny. Ponieważ spin jest wielkością kwantowomechaniczną, rzut jądrowego momentu magnetycznego na wybraną oś jest także skwantowany. Jego operator może być opisany następująco:

$$\vec{\mu}_z = \gamma \hbar \vec{I}_z, \quad (3.4)$$

gdzie $\vec{I}_z$ – operator rzutu spinu związanego z osią kwantyzacji. Wartości własne operatora $\vec{\mu}_z$ to:

$$\lambda_{\mu_z} = m\gamma\hbar, \quad (3.5)$$

gdzie m przyjmuje wartości $-I, -I+1, \dots, I-1, I$, gdzie I jest liczbą kwantującą spin jądra.

3.2.2 Energia oddziaływania momentu magnetycznego z zewnętrznym polem magnetycznym

Jądro atomowe posiadające moment magnetyczny oddziałuje z zewnętrznym polem magnetycznym. Klasycznie energia potencjalna takiego oddziaływania dana jest przez:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (3.6)$$

Kierunek pola $\vec{B}_0$ zwykle oznaczany jest jako kierunek osi z . W takim przypadku energia oddziaływania może być opisana jako:

$$E = -\mu_z B_0 \quad (3.7)$$

Skoro moment magnetyczny jądra jest skwantowany (równanie (3.4)), hamiltonian energii oddziaływania można opisać przez:

$$H = -\gamma\hbar B_0 I_z, \quad (3.8)$$

a jego wartości własne wynoszą:

$$E = -m\gamma\hbar B_0 \quad (3.9)$$

Różnica energii między dwoma sąsiednimi poziomami energetycznymi wynosi:

$$\Delta E = E(m+1) - E(m) = -(m+1)\gamma\hbar B_0 + m\gamma\hbar B_0 = -\gamma\hbar B_0 \quad (3.10)$$

Jeżeli magnetyczna liczba kwantowa m przyjmuje wartości ze zbioru $\{-I, -I+1, \dots, I-1, I\}$, umieszczone w polu magnetycznym $\vec{B}_0$ jądro będzie mogło przyjąć $2I+1$ stanów energetycznych.

3.2.3 Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego

3.2.3.1 Obsadzenia poziomów energetycznych

Makroskopowa próbka zawiera bardzo wiele jąder (rzędu liczby Avogadro). W temperaturze pokojowej, na skutek ruchów termicznych, poziomy o wyższej energii oddziaływania również są obsadzone. Stosunek obsadzeń N_{E1} i N_{E2} dwóch sąsiednich poziomów energetycznych o energiach E_1 i E_2 dany jest rozkładem Boltzmanna:

$$\frac{N_{E_2}}{N_{E_1}} = e^{-\frac{E_2 - E_1}{kT}}. \quad (3.11)$$

Ponieważ różnica energii poziomów magnetycznych jąder jest bardzo mała w porównaniu z energią termiczną (tzn., gdy $kT \gg \hbar B_0$), Na przykład stosunek obsadzeń opisany równaniem (3.11) jest zbliżony do 1, a dla jąder ^1H w polach magnetycznych o wartości indukcji kilku tesli różnica jest rzędu jednego jądra na milion. Ponieważ w próbce znajduje się liczba jąder rzędu 10^{24} , różnica obsadzeń w całej makroskopowej próbce jest rzędu 10^{18} , co powoduje, że wypadkowy moment magnetyczny staje się już mierzalny.

3.2.3.2 Magnetyzacja próbki

Opis klasyczny zjawiska MRJ jest możliwy tylko w stosunku do wypadkowego momentu magnetycznego próbki makroskopowej. Magnetyzacja $\vec{M}$ jest wypadkowym momentem magnetycznym na jednostkę objętości próbki:

$$\vec{M} = \frac{\sum_n^n \vec{\mu}_n}{V} \quad (3.12)$$

W nieobecności zewnętrznego pola magnetycznego, rozkład momentów magnetycznych jest izotropowy a wartość magnetyzacji wynosi 0. Jeśli jednak próbka zostanie umieszczona w polu magnetycznym o indukcji $\vec{B}_0$ (skierowanej wzdłuż osi z laboratoryjnego układu

odniesienia), składowa M_z wektora magnetyzacji staje się niezerowa, natomiast pozostałe (M_x i M_y) nadal uśredniają się do 0:

$$M_x = \frac{\sum_{n=1}^n \mu_{nx}}{V} = 0 \quad (3.13a)$$

$$M_y = \frac{\sum_{n=1}^n \mu_{ny}}{V} = 0 \quad (3.13b)$$

$$M_z = \frac{\sum_{n=1}^n \mu_{nz}}{V} = \frac{\sum_{m=-I}^I \mu_{zm} N_m}{V} \quad (3.14)$$

Magnetyzacja próbki w stanie równowagi termodynamicznej jest niezerowa oraz równoległa do indukcji magnetycznej $\vec{B}_0$.

3.2.3.3 Ruch magnetyzacji w stałym polu magnetycznym

Ponieważ magnetyzacja jest proporcjonalna do sumy momentów magnetycznych jąder próbki zachodzi dla niej:

$$\vec{M} = \gamma \vec{K} \quad (3.15)$$

gdzie $\vec{K}$ jest wektorem momentu pędu przypadającym na jednostkę objętości próbki.

Z równań (3.15) i (3.2) oraz wykorzystując drugą zasadę dynamiki dla ruchu obrotowego :

$$\frac{d}{dt} \vec{K} = \vec{M}_s, \quad (3.16)$$

gdzie $\vec{M}_s = \vec{r} \times \vec{F}$ jest wektorem momentu siły, otrzymujemy równanie ruchu wektora magnetyzacji:

$$\frac{d}{dt} \vec{M} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad (3.17)$$

Ogólne rozwiązanie równania wektorowego (3.17) sprowadza się do rozwiązania układu trzech równań różniczkowych. Można je też sprowadzić do układu wirującego, którego jedna z osi - z' ($\vec{B}_0 \parallel z'$) i środek pokrywają się z osią z i środkiem układu laboratoryjnego.

Transformacja wektora prędkości, $\vec{v}'$, poruszającego się punktu z układu wirującego do prędkości w układzie laboratoryjnym, $\vec{v}$:

$$\vec{v} = \vec{v}' + \vec{\omega} \times \vec{r} \quad (3.18)$$

gdzie $\vec{\omega}$ to prędkość kątowna układu wirującego względem układu laboratoryjnego, natomiast $\vec{r}$ to wektor wodzący punktu.

Wektor magnetyzacji można potraktować jak wektor wodzący pewnego punktu. Kładąc $\vec{r} \rightarrow \vec{M}$ oraz z definicji

$$\vec{v}' = \left(\frac{d}{dt} \vec{M} \right)' \quad (3.19)$$

otrzymujemy

$$\vec{v} = \frac{d}{dt} \vec{M} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0. \quad (3.20)$$

Podstawiając (3.19) i (3.20) do (3.18) dostajemy:

$$\gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 = \left(\frac{d}{dt} \vec{M} \right)' + \vec{\omega} \times \vec{M}, \quad (3.21)$$

co po przekształceniach prowadzi do:

$$\left(\frac{d}{dt} \vec{M} \right)' = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 - \vec{\omega} \times \vec{M} \quad (3.22)$$

$$\left(\frac{d}{dt} \vec{M} \right)' = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 + \vec{M} \times \vec{\omega} \quad (3.23)$$

$$\left(\frac{d}{dt} \vec{M} \right)' = \gamma \vec{M} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} \right) \quad (3.24)$$

Związek (3.24) przedstawia równanie ruchu wektora magnetyzacji w układzie wirującym i formalnie ma zbliżoną postać do równania (3.17). Jeśli podstawimy:

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} \quad (3.25)$$

forma równań staje się identyczna, przy czym $\vec{B}_{eff}$ jest indukcją pola magnetycznego mierzoną w układzie wirującym (tak zwane pole efektywne).

W szczególnym przypadku, dla częstości Larmora równej,

$$\vec{\omega}_0 = -\gamma\vec{B}_0, \quad (3.26)$$

równanie (3.21) ma postać:

$$\left(\frac{d}{dt}\vec{M}\right)' = \gamma\vec{M} \times \left(\vec{B}_0 - \frac{\gamma\vec{B}_0}{\gamma}\right), \quad (3.27)$$

czyli

$$\left(\frac{d}{dt}\vec{M}\right)' = 0 \quad (3.28)$$

i prowadzi do:

$$\vec{M}' = const \quad (3.29)$$

natomiast efektywne pole magnetyczne wynosi zero.

W układzie wirującym z częstością Larmora, $\vec{\omega}_0 = -\gamma\vec{B}_0$, wektor magnetyzacji pozostaje w spoczynku. Oznacza to, że w układzie laboratoryjnym magnetyzacja precesuje - jej ruch można opisać następująco:

$$M_x = M_{\perp} \cos(\omega_0 t) \quad (3.30a)$$

$$M_y = M_{\perp} \sin(\omega_0 t) \quad (3.30b)$$

$$M_z = const, \quad (3.30c)$$

przy czym: $M_{\perp}$ jest rzutem wektora $\vec{M}$ na płaszczyznę xy, a M_z - na oś z.

Ruch ten nazywany jest precesją Larmora, a wartość prędkości kątowej $\vec{\omega}_0$ - częstością Larmora.

Należy zwrócić uwagę, że jeżeli rozwiązaniem równania (3.17) jest precesująca magnetyzacja wokół wektora $\vec{B}_0$, to rozwiązaniem równania

$$\left(\frac{d}{dt}\vec{M}\right)' = \gamma\vec{M} \times \vec{B}_{eff} \quad (3.31)$$

w układzie wirującym jest również precesująca w tym układzie magnetyzacja, tyle, że wokół „widzianego” pola magnetycznego o indukcji $\vec{B}_{eff}$ i z prędkością kątową:

$$\vec{\omega} = -\gamma\vec{B}_{eff} \quad (3.32)$$

3.2.3.4. Ruch magnetyzacji w stałym i zmiennym polu magnetycznym – rezonans magnetyczny

Jeśli umieścić próbkę w wypadkowym polu magnetycznym, na które składa się stałe pole o indukcji $\vec{B}_0 \parallel z$ i wirujące w płaszczyźnie xy z prędkością kątową $\vec{\omega}_e$ pole magnetyczne o indukcji $\vec{B}_1$, to w układzie wirującym z prędkością kątową $\vec{\omega}_e$ równanie ruchu wektora magnetyzacji, na mocy (3.24) będzie miało postać:

$$\left(\frac{d}{dt}\vec{M}\right)' = \gamma\vec{M} \times \left(\vec{B}_0 + \vec{B}_1 + \frac{\vec{\omega}_e}{\gamma}\right), \quad (3.33)$$

a pole o indukcji $\vec{B}_1$ będzie polem stałym w układzie wirującym. Jeśli dodatkowo prędkość wirowania jest taka, że $\vec{\omega}_e = -\gamma\vec{B}_0$, to jedynym polem obecnym w układzie wirującym jest to o indukcji $\vec{B}_1$. Wtedy w układzie wirującym precesja wektora $(\vec{M})'$ odbywa się wokół $\vec{B}_1$, co prowadzi do odchyłania wektora $(\vec{M})'$ od osi z' . Ponieważ $B_1 \ll B_0$, odchylenia wektora magnetyzacji można dokonać tylko za pomocą pola magnetycznego wirującego z częstością γB_0 lub bardzo bliską tej wartości. Zjawisko odchylenia wektora magnetyzacji od położenia równowagi jest w klasycznym ujęciu zjawiskiem magnetycznego rezonansu jądrowego.

3.2.3.5 Procesy relaksacyjne

Pochłonięcie przez próbkę energii wiąże się z wychyleniem wektora magnetyzacji z położenia równowagi. Po ustaniu działania zmiennego pola magnetycznego, magnetyzacja

zaczyna wykonywać ruch wokół kierunku stałego pola o indukcji $\vec{B}_0$ zgodnie z równaniami (3.30). Ponadto do stałego pola magnetycznego występującego w miejscu danego spinu dodają się pola magnetyczne generowane przez sąsiednie spiny. Pola te mogą się zmieniać w sposób przypadkowy – na przykład wskutek ruchów Browna. Procesy te powodują zaburzenie ruchu wektora magnetyzacji, przyczyniając się do jego powrotu do położenia równowagi (w obrazie półklasycznym - składające się na nią spiny zaczynają precesować z różnymi szybkościami). Relaksację magnetyczną można podzielić na: relaksację podłużną (spin – sieć) i relaksację poprzeczną (spin – spin).

3.2.3.6 Relaksacja spin - sieć

Relaksacja podłużna (spin – sieć) to powrót składowej M_z wektora magnetyzacji do wartości równowagowej. Związana jest z oddawaniem energii do otoczenia (sieci – ogółu innych poziomów energetycznych układu).

Relaksacja spinowo-sieciowa opisana jest równaniem:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad (3.34)$$

gdzie M_0 to równowagowa wartość magnetyzacji, T_1 to czas relaksacji spinowo-sieciowej.

Rozwiązaniem równania (3.34) jest funkcja:

$$M_z(t) = -2M_0 e^{-\frac{t}{T_1}} + M_0, \quad (3.35)$$

w przypadku jeśli:

$$M_z(t=0) = -M_0. \quad (3.36)$$

3.2.3.7 Relaksacja spin – spin

Relaksacja poprzeczna (spin – spin) jest zanikiem poprzecznej składowej $M_\perp$ wektora magnetyzacji. Ponieważ ta składowa jest prostopadła do wektora $\vec{B}_0$, nie towarzyszy jej

wymiana energii układu z otoczeniem. Wskutek oddziaływania z innymi spinami, tracone jest uporządkowanie.

Relaksacja spinowo-spinowa opisana jest równaniem:

$$\frac{dM_{\perp}}{dt} = -\frac{M_{\perp}}{T_2}, \quad (3.37)$$

gdzie $M_{\perp}$ to składowa poprzeczna wektora magnetyzacji, zaś T_2 oznacza czas relaksacji poprzecznej (spinowo–spinowej).

Jeśli w chwili $t = 0$ wektor magnetyzacji znajdował się na płaszczyźnie xy , tj.

$$M_{\perp}(t=0) = M_0, \quad (3.38)$$

wówczas rozwiązaniem równania (3.37) jest funkcja:

$$M_{\perp}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}}. \quad (3.39)$$

Równania (3.34) i (3.37) opisujące ruch magnetyzacji przy uwzględnieniu oddziaływań spinów ze sobą to części relaksacyjne równań Blocha. Relaksacja poprzeczna i relaksacja podłużna scharakteryzowana jest różnymi stałymi czasowymi. Dzieje się tak, ponieważ wektor magnetyzacji jest statystyczną sumą momentów magnetycznych jąder wchodzących w skład próbki, natomiast wymiana energii układu spinów jądrowych z otoczeniem oraz utrata koherencji precesujących spinów są w ogólności zjawiskami niezależnymi.

3.3. Kwantowe ujęcie magnetycznego rezonansu jądrowego i procesu relaksacji.

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego zachodzi, gdy spin jądrowy pochłonie porcję energii dostarczonej mu przez falę elektromagnetyczną. Aby było to możliwe, energia $E = \hbar\omega$ niesiona przez kwant promieniowania musi odpowiadać różnicy energii między jądrowymi poziomami energetycznymi zeemanowskimi. Na mocy (3.10), warunkiem wystąpienia zjawiska MRJ jest:

$$\hbar\omega = |\gamma\hbar B_0|, \quad (3.40)$$

czyli

$$\omega = |\gamma B_0| \quad (3.41)$$

Proces relaksacji skutecznie tłumaczy teoria BWRH [Hubbard, 1961; Redfield, 1957; Wangsness, Bloch, 1953], w której podstawową rolę odgrywa operator gęstości spinowej.

3.3.1 Gęstość spinowa stanów

Operator gęstości spinowej $\hat{\rho}$ stosuje się do opisu procesów statystycznych zachodzących w próbce. Jest on operatorem macierzowym, w którym wyrazy diagonalne odpowiadają tzw. stanom czystym (których energie równe są tym wynikającym z rozszczepienia Zeemana), a pozostałe – stanom mieszanym, będącym superpozycją stanów czystych [Abragam, 1961, Blicharski, 1972].

Teoria BWHR traktuje zmienne spinowe kwantowo, natomiast przestrzenne – klasycznie. Do opisu zmiennych spinowych stosuje się zredukowany operator gęstości $\hat{\sigma}(t)$, będący sumą elementów diagonalnych operatora $\hat{\rho}(t)$ po zmiennych sieci.

$$\hat{\sigma}(t) = Tr_f(\hat{\rho}(t)) \quad (3.42)$$

Jeśli przyjąć, że operator $\hat{\sigma}$ jest znormalizowany tak, że:

$$Tr \hat{\sigma} = 1, \quad (3.43)$$

wówczas spełni on równanie:

$$\frac{d\hat{\sigma}(t)}{dt} = -i[\hat{H}, \hat{\sigma}(t)], \quad (3.44)$$

Równanie (3.44) nosi nazwę równania Liouville’a von Neumanna i w mechanice kwantowej jest podstawowym równaniem opisującym ewolucję operatorów macierzowych. Dzięki wprowadzeniu operatora $\hat{\sigma}$ staje się możliwe wyznaczenie wartości oczekiwanej dowolnego operatora obserwabli $\langle \hat{Q} \rangle(t)$:

$$\langle \hat{Q} \rangle(t) = Tr(\hat{Q}\hat{\sigma}(t)), \quad (3.45)$$

Niech $\hat{H}$ będzie hamiltonianem spinowym składającym się z dwóch części – statycznej $\hat{H}_0$ oraz zależnej od czasu $\hat{H}'$ reprezentująca zaburzenie:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}'. \quad (3.46)$$

Jeśli $\hat{H}_0 = -\omega_0 \hat{I}_z$ (oddziaływanie zeemanowskie), wówczas przejście do reprezentacji oddziaływania, wiążące się z transformacją do układu wirującego wokół osi z z częstością kołową równą $\omega_0 = \gamma \mathcal{B}_0$ ma postać:

$$\tilde{X} = e^{iH_0 t} X e^{-iH_0 t} \quad (3.47)$$

Przejście takie powoduje, że prawa strona równania Liouville'a von Neumanna (3.44) ulega uproszczeniu do dwóch pierwszych iteracji. Jeśli czasy korelacji są krótkie oraz nie występuje korelacja między operatorami $\hat{\rho}$ oraz $\hat{H}'$, wówczas:

$$\frac{d\tilde{\sigma}}{dt} = -(A(\tilde{\sigma}) - A(\tilde{\sigma}_0)) = -\hat{\Gamma} \cdot (\tilde{\sigma} - \tilde{\sigma}_0), \quad (3.29) \quad (3.48)$$

$$\frac{d\sigma}{dt} = -i[H_0, \sigma] - \hat{\Gamma} \cdot (\sigma - \sigma_0) \quad (3.49)$$

gdzie:

$$A(\sigma) = \hat{\Gamma} \cdot \sigma = \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle [\tilde{H}'(t), [\tilde{H}'(t+\tau), \sigma]] \rangle d\tau \quad (3.50)$$

oraz

$$\sigma_0 = \frac{e^{\frac{H_0}{kT}}}{Tr e^{\frac{H_0}{kT}}} \quad (3.51)$$

jest równowagową wartością operatora $\hat{\sigma}$.

Dla każdego operatora $\hat{Q}$ czasy relaksacji dla jego wartości oczekiwanych $\langle Q \rangle$ wyrażają się przez [Blicharski i in., 1994]:

$$\frac{1}{T_Q} = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} Tr\{[\hat{Q}, \tilde{H}(t)][\hat{Q}, \tilde{H}(t+\tau)]^+\} d\tau}{2Tr(\hat{Q} \cdot \hat{Q}^+)} \quad (3.52)$$

Wartości te spełniają równanie Blocha:

$$\frac{d \langle Q \rangle}{dt} = - \frac{\langle Q \rangle - \langle Q_0 \rangle}{T_Q} \quad (3.53)$$

Jeśli przyjąć $\hat{Q} = I_z$, $\hat{Q} = (I_+ + I_-)/2$, gdzie $I_{\pm} = I_x \pm iI_y$, dla składowych magnetyzacji: $M_z = \gamma \hbar \langle I_z \rangle$ i $M_x = \gamma \hbar \langle I_x \rangle$, otrzymujemy formuły opisujące czasy relaksacji podłużnej T_1 i poprzecznej T_2 .

Zredukowany operator gęstości $\hat{\sigma}(t)$ może zostać przedstawiony w rozwinięciu Fano [Rose, 1957; Wigner, 1959], czyli jako liniowa kombinacja tensorów kulistych:

$$\sigma(t) = \sum_{j=1}^{n^2} c_j(t) T_j, \quad (3.54)$$

gdzie n^2 jest wymiarem przestrzeni Liouville'a, a n – przestrzeni Hliberta, $T_j = T_{LM}(\vec{I}_1, \dots, \vec{I}_N)$ są ortonormalnymi spinowymi tensorami kulistymi, natomiast c_j współczynnikami kombinacji liniowej. Tensory T_j uzyskiwane są w procesie polaryzacji sferycznych harmonik ze składowych dowolnego wektora $\vec{a}$ [Edmonds, 1957] i wyrażone poprzez funkcje Racah'a $C_{LM}(\theta, \varphi)$:

$$T_{LM}(\vec{a}_1, \dots, \vec{a}_l) = \mathcal{N}_L \prod_{k=1}^L (\vec{a}_k \cdot \nabla) \{ r^L C_{LM}(\theta, \varphi) \} \quad (3.55)$$

przy czym $\mathcal{N}_L$ jest czynnikiem normalizacyjnym. Gdy rozważamy przestrzeń Liouville'a, wartości oczekiwane tensorów kulistych równe są odpowiednim współczynnikom w kombinacji liniowej (3.54):

$$\langle T_j \rangle(t) = \langle T_j | \sigma(t) \rangle = \text{Tr}(T_j^+ \sigma(t)) = c_j(t) \quad (3.56)$$

Równania (3.49) oraz (3.54), (3.55), (3.56) prowadzą do:

$$\frac{d \langle T_j \rangle}{dt} = - \sum_k A_{jk} \langle T_k \rangle - \sum_k R_{jk} (\langle T_k \rangle - \langle T_k \rangle_{eq}), \quad (3.57)$$

przy czym macierz dynamiki spinowej dana jest przez:

$$A_{jk} = i \text{Tr} \{ T_j^+ [T_k, \tilde{H}_0] \}, \quad (3.58)$$

a macierz relaksacji R_{jk} :

$$R_{jk} = \frac{1}{T_{jk}} = \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{+\infty} Tr \left\{ [T_{ji}, \tilde{H}(t)] [T_k, \tilde{H}(t+\tau)]^+ \right\} d\tau, \quad (3.59)$$

3.3.2. Proces relaksacji w układach biologicznych

3.3.2.1 Hamiltonian układu spinów

Hamiltonian układu spinów jądrowych H dany jest przez hamiltonian H_Z oddziaływania zeemanowskiego (ze stałym polem magnetycznym) oraz hamiltonian H_I oddziaływania dipolowego z polami lokalnymi wytwarzanymi przez spiny:

$$H = H_Z + H_I, \quad (3.60)$$

Część hamiltonianu H odpowiedzialną za oddziaływanie z polami lokalnymi można podzielić na część statyczną $\langle H_I \rangle$ będącą średnią wartością hamiltonianu H_I oraz część zależną od czasu $H'(t)$ opisującą małe fluktuacje:

$$H_I = \langle H_I \rangle + H'(t), \quad (3.61)$$

Równania 3.60 i (3.61) łączą się do:

$$H = H_Z + \langle H_I \rangle + H'(t), \quad (3.62)$$

Pierwsze dwa składniki po prawej stronie równania (3.62) stanowią część statyczną H_0 hamiltonianu spinowego natomiast ostatni – część zależną od czasu.

Za proces relaksacji w przypadku układów biologicznych głównie odpowiada oddziaływanie dipolowe jąder o spinie $I = \frac{1}{2}$, a także oddziaływanie kwadrupolowe jąder, dla których liczba kwantująca spin $I \geq 1$. Hamiltonian oddziaływania dipolowego H_D ma postać:

$$H_D = \sum_{i>j} d_{ij} [\vec{I}_i \cdot \vec{I}_j - 3(\vec{I}_i \cdot \hat{r}_{ij})(\vec{I}_j \cdot \hat{r}_{ij})], \quad (3.63)$$

gdzie I_i oraz I_j są dwoma różnymi spinami, a γ_i i γ_j ich czynnikami żyromagnetycznymi,

$d_{ij} = \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j \hbar}{4\pi r_{ij}^3}$ - nazywana jest stałą dipolową (stałą oddziaływania dipolowego), natomiast

$\hat{r}_{ij}$ jest wersorem wektora $\vec{r}_{ij}$ o kierunku wyznaczonym przez prostą, na której leżą spiny i oraz j i zwrocie od spinu i do spinu j .

Wskutek termicznych ruchów molekuł, wektor $\vec{r}_{ij}(t)$ staje się przypadkową funkcją czasu i można go wyrazić w układzie współrzędnych sferycznych jako poprzez:

$$H_D' = \sum_{i<j} \sum_{M=-2}^2 T_{2M}^{ij} X_{2M}^{ij}(t), \quad (3.64)$$

przy czym:

$$T_{2M}^{ij} = T_{2M}(\vec{I}_i, \vec{I}_j), \quad (3.65)$$

$$X_{2M}^{ij} = F_{2M}^{ij}(t) - \langle F_{2M}^{ij} \rangle, \quad (3.66)$$

$$F_{2M}^{ij}(t) = d_{ij} \sqrt{\frac{4\pi}{5}} Y_{2M}(\theta_{ij}(t), \varphi_{ij}(t)), \quad (3.67)$$

W przypadku, gdy rozważana para spinów nie jest równoważna chemicznie, oprócz oddziaływania dipolowego należy uwzględnić także pośrednie oddziaływanie skalarne przez powłoki elektronowe [Abragam, 1961], którego hamiltonian H_{sk} jest dany przez:

$$H_{sk} = \sum_{i<j} A_{ij} \vec{I}_i \cdot \vec{I}_j, \quad (3.68)$$

gdzie A_{ij} jest stałą sprzężenia skalarnego. W obecności szybkiej wymiany chemicznej, stała sprzężenia staje się funkcją czasu i może przyjmować wartość 0 lub A_{ij} . Wówczas hamiltonian oddziaływania skalarnego można rozłożyć na część statyczną oraz część zależną od czasu postaci:

$$H_{sk}' = \sum_{i<j} T_{00}^{ij} X_{00}^{ij}(t), \quad (3.69)$$

gdzie:

$$T_{00}^{ij} = \sum_{M_1 M_2} C_{1M_1 1M_2}^{00} T_{1M_1}^i T_{1M_2}^j, \quad (3.70)$$

$$X_{00}^{ij}(t) = \left(A_{ij}(t) - \langle A_{ij} \rangle \right) \mathfrak{K}_0^{-1}, \quad (3.71)$$

a $C_{1M_1 1M_2}^{00}$ jest współczynnikiem Clebscha.

3.3.2.2. Relaksacja na skutek oddziaływania dipolowego i skalarnego

Gdy układ składa się ze spinów rezonujących, I, oraz spinów nierezonansowych S, zredukowana gęstość spektralna oraz czas korelacji τ_c związane są ze sobą zależnością [Blicharski, 1972]:

$$j_{LM}(\omega) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \langle X_{LM}^{ij}(t) X_{LM}^{ij*}(t+\tau) \rangle e^{i\omega\tau} d\tau}{\langle |X_{LM}^{ij}|^2 \rangle} = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}, \quad (3.72)$$

pod warunkiem spełniania przez funkcje korelacji warunku (dla dyfuzji rotacyjnej w środowisku lepkim):

$$\langle X_{LM}^{ij}(t) X_{LM}^{ij*}(t+\tau) \rangle = \langle |X_{LM}^{ij}| \rangle e^{-\frac{|\tau|}{\tau_c}}, \quad (3.73)$$

Z równań (3.72) oraz (3.59) można wyznaczyć szybkości relaksacji dla oddziaływań dipolowych:

$$\left(\frac{1}{T_1} \right)_{I-I} = \frac{2\Delta M_2^{II}}{3} \left(\frac{\tau_2}{1 + \omega_I^2 \tau_2^2} + \frac{4\tau_2}{1 + 4\omega_I^2 \tau_2^2} \right), \quad (3.74a)$$

$$\left(\frac{1}{T_2} \right)_{I-I} = \frac{\Delta M_2^{II}}{3} \left(3\tau_2 + \frac{\tau_2}{1 + \omega_I^2 \tau_2^2} + \frac{4\tau_2}{1 + 4\omega_I^2 \tau_2^2} \right) \quad (3.74b)$$

$$\left(\frac{1}{T_1} \right)_{I-S} = \frac{\Delta M_2^{IS}}{2} \left(\frac{3\tau_{20}}{1 + \omega_I^2 \tau_{20}^2} + \frac{\tau_{21}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{21}^2} + \frac{6\tau_{21}}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_{21}^2} \right) \quad (3.75a)$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_{I-S} = \frac{\Delta M_2^{IS}}{4} \left(4\tau_{20} + \frac{3\tau_{20}}{1 + \omega_I^2 \tau_{20}^2} + \frac{\tau_{21}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{21}^2} + \frac{6\tau_{22}}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_{22}^2} + \frac{6\tau_{21}}{1 + \omega_S^2 \tau_{21}^2} \right) \quad (3.75b)$$

przy czym równania (3.74a) i (3.74b) opisują szybkości relaksacji związanej z oddziaływaniem spinów jednakowych, I, a równania (3.75a) i (3.75b) spinów I z różnymi spinami S oraz

$$\Delta M_2^{II} \cong \frac{3}{5} I(I+1) N_I^{-1} \sum_{i,j=1}^{N_I} d_{ij}^2, \quad (3.76a)$$

$$\Delta M_2^{IS} \cong \frac{4}{15} S(S+1) N_I^{-1} \sum_{i,s=1}^{N_I} d_{is}^2 \quad (3.76b)$$

Ponieważ spiny I oraz S nie są równoważne chemicznie, występuje oddziaływanie skalarne, a szybkość wywołanej przez nie relaksacji można wyrazić jako:

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{sk} = 2\Delta M_2^{sk} \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{e2}^2} \right) \quad (3.77a)$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right)_{sk} = \Delta M_2^{sk} \left(\tau_{e1} + \frac{\tau_{e2}}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_{e2}^2} \right) \quad (3.77b)$$

gdzie:

$$\Delta M_2^{sk} \cong \frac{S(S+1)}{3} N_I^{-1} \sum_{i,s=1}^{N_I} A_{is} \quad (3.78)$$

Opisane równaniami (3.76a), (3.76b), (3.78) wielkości ΔM_2 są drugimi momentami statystycznymi linii rezonansowej

Z każdą molekułą można związać wektor ją reprezentujący zwany dyrektorem. W temperaturze wyższej od zera bezwzględnego, molekułom towarzyszy ciągły chaotyczny ruch. Czas korelacji to czas, jaki jest potrzebny do zmiany kierunku dyrektora o kąt równy $\sqrt{2/3}$ rad średnio dla zespołu molekuł. Jeśli przyjmuje małe wartości, oznacza to, że molekuły są ruchliwe, natomiast jeśli molekuły poruszają się wolno, czas korelacji przyjmuje duże wartości. Molekuły w fazie stałej oraz w cieczy różnią się ruchliwością, a więc i średnimi czasami korelacji, które dla ciała stałego długie, natomiast dla cieczy krótkie. W przypadku

obecności jednego typu spinów, analiza równań (3.74a) oraz (3.74b) prowadzi do zależności asymptotycznej:

$$T_1 \sim \tau_c, \quad T_2 \sim \frac{1}{\tau_c}, \quad (3.79)$$

natomiast dla cieczy do:

$$T_1 \sim \frac{1}{\tau_c}, \quad T_2 \sim \frac{1}{\tau_c}, \quad (3.80)$$

Oznacza to – równanie (3.79), że dla spinów w ciele stałym czas relaksacji T_1 jest długi, a czas relaksacji T_2 jest krótki, natomiast dla cieczy – równanie (3.80) – zarówno czasy T_1 jak i T_2 są długie.

3.4 Teoretyczne podstawy pomiarów MRJ w domenie czasu i częstości

3.4.1 Efekt wirującego pola magnetycznego $\vec{B}_1$

Wirujące pole magnetyczne można zastąpić sinusoidalnie zmiennym polem magnetycznym, wytwarzanym za pomocą cewki nadawczej, do której końców przykłada się sinusoidalnie siłę elektromotoryczną o częstości Larmora. Drgające pole magnetyczne można rozłożyć na dwie składowe wirujące w przeciwnych kierunkach – jedna z częstością larmorowską i druga z anylarmorowską. W układzie wirującym z częstością antylarmorowską pole $\vec{B}_0$ ulega podwojeniu, a ponieważ amplituda drgającego pola magnetycznego jest znacznie mniejsza niż wartość indukcji B_0 stałego pola magnetycznego, nie następuje obrót wektora magnetyzacji.

3.4.2 Sygnał zaniku swobodnej precesji (FID)

Na skutek działania pola $\vec{B}_1$, w układzie wirującym z częstością Larmora, magnetyzacja jądrowa wykonuje obrót wokół kierunku x' . Kąt α , jaki zakresli wektor magnetyzacji w

wirującym układzie odniesienia zależy od czasu trwania impulsu wirującego z częstością Larmorowską pola o indukcji $\vec{B}_1$:

$$\alpha = \gamma B_1 t \quad (3.81)$$

Jeśli impuls pola magnetycznego odchyła wektor magnetyzacji o kąt $\alpha = 90^\circ$ nazywany jest impulsem $\pi/2$.

Po ustaniu impulsu pola $\vec{B}_1$, wektor magnetyzacji wykonuje precesję wokół pola $\vec{B}_0$, a jednocześnie powraca do wartości równowagowej wskutek procesów relaksacyjnych, do położenia równowagowego. Do procesów relaksacyjnych (rozdz.3.3.2) dodają się skutki niejednorodności pola $\vec{B}_0$.

Siła elektromotoryczna indukowana w cewce odbiorczej pod wpływem zmieniającej się w czasie poprzecznej składowej magnetyzacji nazywana jest sygnałem zaniku swobodnej precesji FID (ang. *Free Induction Decay*).

W układach biologicznych, w których woda odgrywa istotną rolę, protonowy sygnał zaniku swobodnej precesji FID jest sumą sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego FID_S oraz protonów cieczowych FID_L :

$$FID(t) = FID_S(t) + FID_L(t) \quad (3.82)$$

Na skutek tego spiny pochodzące z różnych części próbki precesują z różnymi częstościami Larmora. Precesujące magnetyzacje od fragmentów próbki o różnym $\vec{B}_0$ rozwijają się w wachlarz. Skraca to czas relaksacji zgodnie z:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2}, \quad (3.83)$$

gdzie: T_2^* jest czasem relaksacji poprzecznej mierzonym z zaniku funkcji FID (efektywny czas relaksacji), a T_2 czasem relaksacji spinowo-sieciowej próbki [Hennel, 1966].

3.4.2.1 Składowa zaniku swobodnej precesji pochodząca od spinów fazy stałej

W próbkach, w których ruchy molekuł są szybkie (np. ciecze), pola lokalne pochodzące od poszczególnych jąder uśredniają się (linia absorpcji jest wąska i opisywana zwykle funkcją Lorentza, a funkcja zaniku swobodnej precesji, zgodnie z równaniami Blocha, jest zależnością eksponencjalną.

W ciałach stałych, oprócz zewnętrznego pola magnetycznego o indukcji $\vec{B}_0$, występują niezerowe pola lokalne. Wówczas sygnał zaniku swobodnej precesji jest bardziej złożoną funkcją.

Składową stałą funkcji zaniku swobodnej precesji, FID_S , można rozwinąć w szereg momentów statystycznych linii MRJ:

$$FID_S(t) = \sum_n M_{2n} (-1)^n \frac{t^{2n}}{(2n)!}. \quad (3.84)$$

3.4.2.1.1 Model funkcji Gaussa

Zastosowanie funkcji Gaussa, będącej złożeniem bardzo wielu eksponent, jest najbardziej typowym sposobem opisu składowej stałej sygnału zaniku swobodnej precesji. Zasadność jej stosowania dla dopasowania składowej stałej funkcji FID można sprawdzić wyznaczając iloraz czwartego i drugiego momentu linii.

Rozwinięcie funkcji Gaussa ma postać:

$$f(t) = e^{-(t/T_{2G})^2} = e^{-\frac{t^2}{2\sigma^2}} = \sum_n (-1)^n \frac{t^{2n}}{n!(2\sigma^2)^n}, \quad (3.85)$$

gdzie: $T_{2G} = \sqrt{2}\sigma$.

Na podstawie porównania równania (3.85) z (3.84) $2n$ moment funkcji Gaussa to:

$$M_{2n} = \frac{(2n)!}{n!(2\sigma^2)^n}, \quad (3.86)$$

Stosunek $\frac{M_4}{(M_2)^2}$ wynosi:

$$\frac{M_4}{(M_2)^2} = \frac{\frac{3}{\sigma^4}}{\frac{1}{\sigma^4}} = 3. \quad (3.87)$$

Dla grzyba zlichenizowanego *Cladonia mitis* iloraz czwartego momentu statystycznego funkcji Gaussa oraz kwadratu drugiego momentu statystycznego wynosi 2.3 [Harańczyk i in., 1998]. Wynik opisany równaniem (3.87) jest zbliżony do tej wartości, co pozwala – w pierwszym przybliżeniu – na stosowanie modelu Gaussa. Ogólnie FID może być opisany złożeniem większej liczby funkcji Gaussa:

$$FID_S(t) = \sum_{i=1}^N S_i e^{-\left(\frac{t}{T_{2Gi}^*}\right)^2}, \quad (3.88)$$

gdzie S_i są amplitudami składowych stałych, a T_{2Gi}^* mierzonymi czasami relaksacji spin – spin.

3.4.2.1.2 Model funkcji Abragama

Abragam zauważył matematyczne podobieństwo rozwinięcia sygnału zaniku swobodnej precesji w szereg momentów do iloczynu funkcji Gaussa i funkcji sincus (nazywanego funkcją Abragama). Wtedy składowa stała FID dana jest przez:

$$FID(t) = S e^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} \cdot \frac{\sin at}{at}, \quad (3.89)$$

gdzie parametr a jest tak zwanym parametrem Abragama i odpowiada szerokości połówkowej linii w domenie częstości [Abragam, 1961].

Po rozwinięciu funkcji Abragama w szereg mamy:

$$M_2 = \frac{1}{\sigma^2} + \frac{1}{3} a^2, \quad (3.90a)$$

$$M_4 = 3 \frac{1}{\sigma^4} + 2 \frac{a^2}{\sigma^2} + \frac{1}{5} a^4, \quad (3.90b)$$

gdzie: $T_{2G} = \sqrt{2} \sigma$.

Na podstawie (3.90a) oraz (3.90b) wartość $\frac{M_4}{(M_2)^2}$ dla funkcji Abragama wynosi:

$$\frac{M_4}{(M_2)^2} = 3 - \frac{\frac{2}{5}a^4}{3\frac{1}{\sigma^4} + 2\frac{a^2}{\sigma^2} + \frac{1}{3}a^4}. \quad (3.91)$$

Zastosowanie funkcji Abragama do analizy FID powoduje wprowadzenie poprawki do równania (3.87). Dla badanych grzybów zlichenizowanych wartości otrzymywane na podstawie równania (3.91) są bliższe 2.3. Dla badanych plech *Cetraria aculeata* stosunek ten, na podstawie równania (3.91) wynosił około 2.7. Występowanie funkcji Abragama w opisie sygnału frakcji stałej często wiąże się z występowaniem fazy szklistej [Derbyshire i in., 2004].

3.4.2.1.3 Model funkcji Pake'a

Trzecim sposobem opisu części sygnału MRJ jest funkcja Pake'a. Model zaproponowany przez Pake w 1948 r [Pake, 1948] ma zastosowanie do substancji proszkowych, w których dipolowo oddziałują dwa najbliższe spiny. Zależy ono od kąta θ , jaki jest tworzony przez wektor $\vec{R}$ oraz wektor indukcji zewnętrznego pola $\vec{B}_0$. Dla pojedynczego mikrokryształu w domenie częstości obserwuje się wówczas dwie identyczne linie, oddalone od siebie o:

$$\Delta\omega = \frac{\mu_0}{8\pi^2} \gamma^2 h \frac{3}{2} R^{-3} (1 - 3\cos^2 \theta). \quad (3.92)$$

Zatem odległość pików od środka widma wynosi:

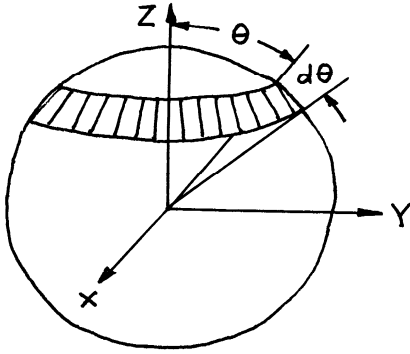
$$\omega = \pm \frac{3}{4} W (3\cos^2 \theta - 1). \quad (3.93)$$

przy czym $W = \frac{\mu_0}{8\pi^2} \gamma^2 h R^{-3}$.

Funkcja Pake'a, $P(\omega)$, opisująca sygnał MRJ w polikryształach musi być tak określona, że wyrażenie $P(\omega)d\omega$ będzie ułamkiem molekuł dających widmo z przedziału $[\omega, \omega + d\omega]$, a więc mających kąt z przedziału $[\theta, \theta + d\theta]$. Aby wyznaczyć funkcję $P(\omega)$ można posłużyć się sferą o promieniu 1. Wówczas liczba molekuł, których kąt należy do przedziału

$[\theta, \theta + d\theta]$ ta będzie proporcjonalna do stosunku pola powierzchni części sfery (Rys. 3.1) do pola całej sfery:

$$P(\omega)d\omega = \left| \frac{2\pi \sin \theta d\theta}{4\pi} \right| = \frac{1}{2} |d(\cos \theta)|. \quad (3.94)$$



Rys. 3.1. Sfera o promieniu 1 obrazująca położenie spinów molekuł. W zaznaczonym fragmencie (pasku) leżą spiny, których kąty $\theta \in [0, 90^\circ]$.

Tak więc funkcja opisująca sygnał MRJ jest proporcjonalna do pochodnej cosinusa kąta θ po częstotliwości:

$$P(\omega) \sim \left| \frac{d(\cos \theta)}{d\omega} \right|. \quad (3.94)$$

Obliczając z równania (3.93) $\cos \theta$:

$$\cos \theta = \sqrt{\frac{1}{3} \left(1 \pm \frac{4\omega}{3W} \right)} \quad (3.95)$$

oraz różniczkując po częstotliwości ostatecznie otrzymujemy związek:

$$P(\omega) \sim \frac{1}{\sqrt{1 \pm \frac{4\omega}{3W}}}. \quad (3.96)$$

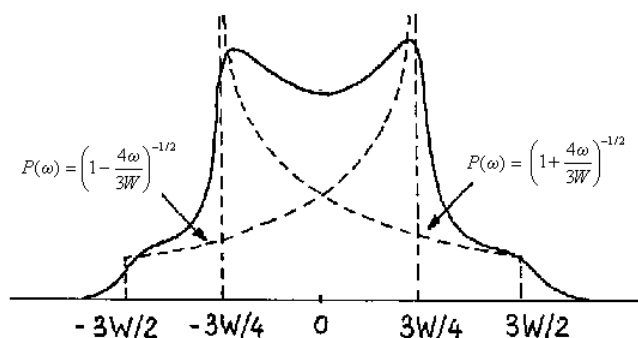
Mając na uwadze, że $\theta \in [0, 90^\circ]$, cała przestrzeń częstotliwości zostanie podzielona na trzy obszary, w których funkcja Pake'a będzie dana przez:

$$P(\omega) = \left(1 - \frac{4\omega}{3W} \right)^{-1/2}, \text{ gdy } -\frac{3W}{2} < \omega < -\frac{3W}{4}, \quad (3.97a)$$

$$P(\omega) = \left(1 - \frac{4\omega}{3W} \right)^{-1/2} + \left(1 + \frac{4\omega}{3W} \right)^{-1/2}, \text{ gdy } -\frac{3W}{4} < \omega < \frac{3W}{4} \quad (3.97b)$$

oraz

$$P(\omega) = \left(1 + \frac{4\omega}{3W}\right)^{-1/2}, \text{ gdy } \frac{3W}{4} < \omega < \frac{3W}{2}. \quad (3.97c)$$

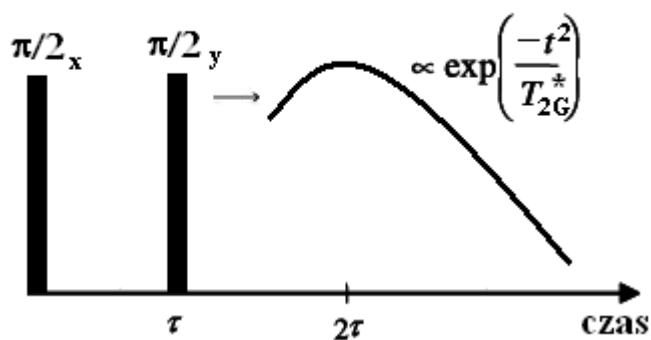


Rys. 3.2. Przykładowy kształt dublet Pake'a dla polikryształu.

Kształt widma MRJ w przypadku występowania wielu dubletów Pake'a przechodzi w kształt transformaty Fouriera z funkcji Abragama.

3.4.2.1.4 Precyzyjne wyznaczenie amplitudy sygnału ciała stałego – metoda *solid echo*

W celu dokładnego wyznaczenia amplitudy S składowej stałej sygnału FID oraz czasów relaksacji poprzecznej T_{2G}^* stosuje się sekwencję dwóch prostopadłych impulsów $\pi/2$ podawanych w płaszczyźnie xy (prostopadłej do wektora indukcji $\vec{B}_0$): $(\pi/2)_x - \tau - (\pi/2)_y$. Sekwencja taka wydobywa części sygnału FID, które relaksują szybko (w porównaniu z czasem martwym spektrometru). Drugi impuls powoduje ponowne obrócenie na płaszczyznę xy wektora magnetyzacji związanej ze spinami, częściowo zdążyły powrócić do stanu równowagi, a więc ze spinami protonów matrycy stałej. Po czasie τ po podaniu drugiego z impulsów obserwuje się sygnał *solid echo*.



Rys. 3.3. Sekwencja impulsów stosowana w metodzie *solid echo* oraz rejestrowany sygnał pochodzący od jąder szybko relaksujących (ciała stałego).

3.4.2.2 Sygnał ciekzowy

W cieczy molekuly wykonują szybkie ruchy, więc składowa sygnału zaniku swobodnej precesji pochodząca od protonów ciekzowych, FID_L może być opisana funkcją eksponencjalną.

W obecności wielu podukładów spinowych, ciekzowy sygnał zaniku swobodnej precesji ma postać:

$$FID_L(t) = \sum_{j=1}^M L_j e^{-\frac{t}{T_{2Lj}^*}}, \quad (3.98)$$

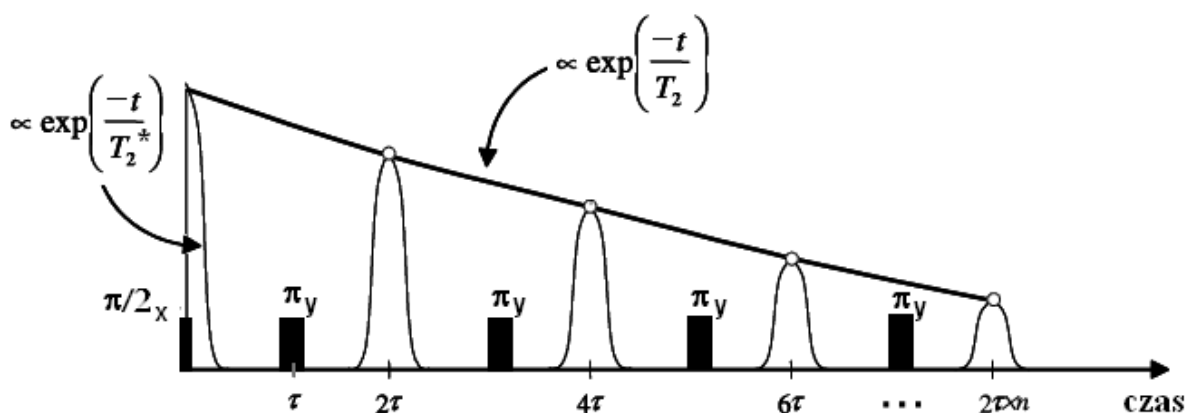
gdzie: L_i to amplitudy poszczególnych składowych ciekzowych, a T_{2L}^* to ich czasy relaksacji poprzecznej, natomiast M jest liczbą podukładów spinowych.

3.4.3. Sekwencja Carlla-Purcela-Meibooma-Gilla (CPMG)

Mierzac sygnał zaniku swobodnej precesji po podaniu impulsu $\pi/2$ wyznacza się efektywna czasy relaksacji poprzecznej T_2^* skrócone przez niejednorodności zewnętrznego pola magnetycznego. Efekt ten jest niewielki dla frakcji stałej, jednak dla protonów ciekzowych staje się bardzo znaczny.

Aby wyznaczyć bezwzględne wartości czasów relaksacji sygnału cieczowego T_2 , stosuje się, po podaniu impulsu $\pi/2$ następującą po sobie sekwencję impulsów równoległych π (sekwencja CPMG): $(\pi/2)_x - \tau - \pi_y - 2\tau - \pi_y - 2\tau - \pi_y \dots$. Po podaniu pierwszego impulsu $(\pi/2)_x$, wskutek niejednorodności zewnętrznego pola magnetycznego, ΔB_0 , magnetyzacja rozwija się w wachlarz. Podanie po czasie τ impulsu π w kierunku osi y' powoduje odwrócenie płaszczyzny $x'y'$ – precesujące z większą szybkością spiny, znajdują się z tyłu, a wolniejsze przed nimi. Po czasie τ od podania impulsu π najszybsze doganiają najwolniejsze, a magnetyzacje znów się dodają, tworząc sygnał echa spinowego (echo Hahna). Gdy wektor magnetyzacji znów ulegnie rozwinięciu, po czasie τ , podaje się kolejny impuls π , wywołujący powtórnie zwinięcie. Wskutek relaksacji spinowo-spinowej, kolejne echa spinowe mają coraz mniejszą amplitudę. Wówczas ich obwiednia wyznacza sygnał MRJ:

$$FID_L(t) = L e^{-\frac{t}{T_{2L}}} \quad (3.99)$$



Rys. 3.4. Sekwencja impulsów w metodzie CPMG.

3.4.4. Widmo absorpcyjne

Widmo absorpcyjne $G(\omega)$ jest transformatą Fouriera sygnału zaniku swobodnej precesji:

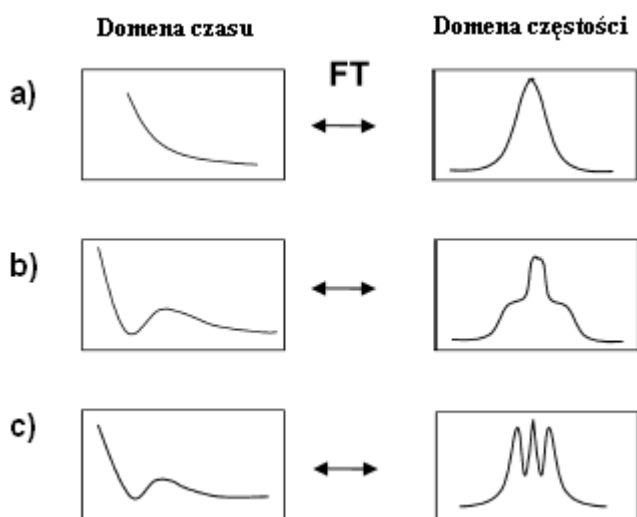
$$G(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} FID(t) e^{-i\omega t} dt \quad (3.100)$$

Jeśli część sygnału FID pochodząca od protonów ciała stałego dobrze opisuje funkcja Gaussa, wówczas, zgodnie z równaniem (3.100), sygnał w domenie częstotliwości również opisany będzie funkcją Gaussa o dużej szerokości połówkowej $\Delta\nu_G$ wyrażonej w jednostkach częstotliwości, przy czym między czasem relaksacji, a szerokością połówkową linii zachodzi związek:

$$T_{2G} = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\pi\Delta\nu_G} \quad (3.101)$$

Spiny są wzbudzone w dużym zakresie częstotliwości wokół częstotliwości rezonansowej. W przypadku, gdy składowa stała FID opisana jest funkcją Abragama, jej transformata Fouriera będzie zawierać funkcję schodkową [Derbyshire i in., 2004]. Analiza funkcji schodkowej w domenie częstotliwości jest trudniejsza niż funkcji Abragama w domenie czasu, stąd dokładną analizę sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego prowadzi się na podstawie sygnałów FID.

Transformatą Fouriera funkcji eksponencjalnej opisującej sygnał FID pochodzący od protonów ciekłych jest funkcja Lorentza o szerokości połówkowej znacznie mniejszej niż funkcja Gaussa opisująca część pochodzącą od frakcji stałej widma. Spiny ciekłe wzbudzone są w znacznie węższym zakresie częstotliwości, który może być dodatkowo poszerzany niejednorodnościami zewnętrznego pola magnetycznego, które w bardzo niewielki sposób wpływają na poszerzenie części widma pochodzącego od protonów ciała stałego.



Rys. 3.5. Związek między sygnałem MRJ frakcji stałej w domenie czasu i domenie częstotliwości: **a)** funkcja Gaussa – funkcja Gaussa, **b)** funkcja Abragama – funkcja Gaussa modyfikowana funkcją schodkową, **c)** funkcja Pake’a w domenie czasu – dublet Pake’a. Rysunek opracowany na podstawie [Derbyshire i in., 2004].

W ogólnym przypadku sygnał w domenie częstotliwości (podobnie jak w domenie czasu) może być opisany kilkoma składowymi pochodzącymi od frakcji stałej:

$$G_S(\nu) = \sum_{i=1}^N \frac{A_{Gi}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_{Gi}} \exp \left[-2 \cdot \left(\frac{\nu - \nu_{Gi}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_{Gi}} \right)^2 \right], \quad (3.102a)$$

i cieczowymi

$$G_L(\nu) = \sum_{j=1}^M \frac{2A_{Lj}}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_{Lj}}{4 \cdot (\nu - \nu_{Lj})^2 + \Delta \nu_{Lj}^2} \right], \quad (3.102b)$$

gdzie A_{Gi} oraz A_{Li} są polami pod powierzchnią krzywej Gaussa i Lorentza, $\Delta \nu_{Gi}$ oraz $\Delta \nu_{Li}$ ich szerokościami połówkowymi, ν_{Gi} , ν_{Li} położeniami ich centrów, a N i M odpowiednio liczbą wyodrębnionych składowych stałych i cieczowych.

3.4.5 Próbki mikroheterogenne

Próbki układów biologicznych charakteryzują się zwykle występowaniem różnych podukładów spinowych. Oprócz podziału na frakcję stałą sygnału oraz frakcję cieczową, we frakcji cieczowej można wyróżnić więcej niż jeden podukład. Każdy z podukładów charakteryzuje się różnymi czasami relaksacji lub szerokościami połówkowymi linii widma .

Na przykład dla protonów matrycy stałej w polu magnetycznym o wartości indukcji $B_0 = 0.7$ T czas relaksacji wynosi $T_{2G}^* \approx 20 \mu s$. Czas ten można utożsamiać z T_{2G} , gdyż dla krótkich wartości czasów relaksacji poprawka wynikająca z niejednorodności pola magnetycznego (3.83) jest niewielka. Natomiast dla frakcji cieczowej można wyróżnić podukład spinów relaksujących szybko ($T_{2L}^* \approx 50 - 180 \mu s$), a odpowiadających wodzie ściśle związanej oraz podukład spinów relaksujących wolno ($T_{2L}^* > 200 \mu s$), od wody luźno związanej. Szerokości połówkowe linii Gaussa dla pól magnetycznych o wartości indukcji $B_0 = 7$ T opisującego sygnał 1H -MRJ w domenie częstości wynoszą $\Delta \nu_G \approx 45$ kHz, a linii Lorentza opisującej sygnał od protonów cieczowych $\Delta \nu_G > 1.5$ kHz dla protonów ściśle związanych, oraz $\Delta \nu_G < 1$ kHz dla protonów luźno związanych.

3.4.6. Spektroskopia relaksacyjna

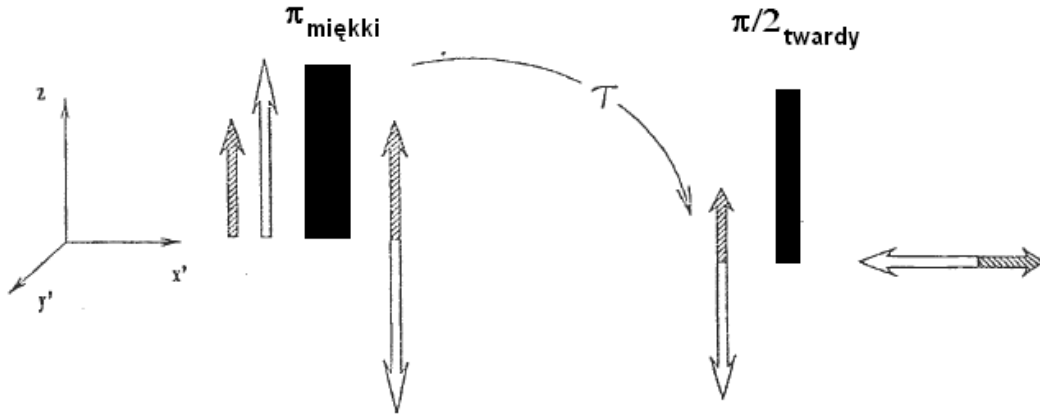
Do wyznaczania czasu relaksacji podłużnej T_1 można wykorzystać spektroskopię relaksacyjną. Metoda polega na podaniu dwóch impulsów – pierwszego π oraz drugiego – $\pi/2$ rozdzielonych czasem τ : $\pi - \tau - \pi/2$. Pierwszy impuls obraca magnetyzację przeciwnie do zwrotu osi z laboratoryjnego układu odniesienia. W czasie τ jądrowe momenty magnetyczne relaksują podłużnie. Drugi impuls obraca magnetyzację na płaszczyznę xy . Czas T_1 można wyznaczyć na podstawie zależności pola pod powierzchnią widma rejestrowanego po drugim impulsie ($\pi/2$) od czasu między impulsami τ . Pole pod powierzchnią linii, proporcjonalne do wartości magnetyzacji, można opisać funkcją eksponencjalną, a w ogólności sumą takich funkcji:

$$M(\tau) = \sum_{i=1}^N M_i (1 - 2e^{-\tau/T_{1(i)}}). \quad (3.103)$$

gdzie N jest liczbą składowych, M_i amplitudą, a $T_{1(i)}$ jej czasem relaksacji podłużnej.

3.4.7. Transfer magnetyzacji między układami spinów

Aby sprawdzić, czy w próbce zachodzi transfer magnetyzacji między poszczególnymi podukładami spinowymi (na przykład między protonami cieczowymi i protonami fazy stałej), stosuje się sekwencję dwóch impulsów, analogiczną do tej stosowanej w metodzie spektroskopii relaksacyjnej: $\pi - \tau - \pi/2$. Pierwszy z impulsów jest impulsem o niskiej mocy (tzw. miękkim), wytwarzającym pole $\vec{B}_1$ nie przekraczające wartości lokalnych pól dipolowych, a więc nie obracającym spinów frakcji stałej próbki, drugi jest impulsem o wysokiej mocy (tzw. impuls twardy). Sekwencja tak dobranych impulsów zwana jest sekwencją *soft – hard*. Po miękkim impulsie π relaksują podłużnie jedynie spiny cieczowe. Jeśli transfer magnetyzacji między składową stałą i cieczową nie występuje, wówczas po zastosowaniu twardego impulsu $\pi/2$ działającego na wszystkie składowe, obserwuje się niezmienny (w stosunku do zastosowania pojedynczego, twardego impulsu $\pi/2$) sygnał od protonów ciała stałego) oraz sygnał od protonów cieczowych, tak jak po użyciu sekwencji *inversion recovery*, zmniejszony skutek relaksacji podłużnej.



Rys. 3.6. Sekwencja *soft – hard*. Magnetyzację frakcji stałej oznaczono ciemną strzałką, a magnetyzację cieczową strzałką białą. Na podstawie: [Rumm, 1992].

Jeśli istnieje transfer magnetyzacji między pulą spinów frakcji stałej i frakcji ciekłej, w czasie τ , oprócz relaksacji podłużnej składowej cieczowej, zachodzi zmniejszenie magnetyzacji protonów ciała stałego kosztem szybszego odrostu magnetyzacji związanej z protonami cieczowymi. Po zastosowaniu twardego impulsu $\pi/2$, sygnał pochodzący od protonów ciała stałego jest mniejszy niż po zastosowaniu pojedynczego impulsu twardego $\pi/2$.

3.4.8. Zależność sygnału ^1H -MRJ od poziomu uwodnienia materiału biologicznego

Wielkość sygnału cieczowego ^1H -NMR wyrażona w jednostkach sygnału stałego, L/S (lub A_L/A_S) może być traktowana jako miara ilości wody związanej w próbce, $\Delta m/m_0$. Jeśli w materiale biologicznym dochodzi jedynie do adsorpcji molekuł wody, wówczas zależność $L/S(\Delta m/m_0)$ jest liniowa. Jeśli wyraz wolny jest większy od zera, oznacza to, że próbka zawiera pewną ilość wody zapuławkowanej, niewykrywalnej metodami grawimetrycznym. Jeśli próbka zawiera frakcją stałą rozpuszczalną we wodzie sygnał cieczowy MRJ, L , może być opisany przez [Harańczyk i in., 1999]:

$$L = \alpha_{H_2O} \rho_{H_2O} \Delta m + \alpha_{cd} \rho_c m_{cd}, \quad (3.104)$$

gdzie Δm jest masą wody związanej, ρ_{H_2O} gęstością protonową wody, m_{cd} masą rozpuszczonej frakcji stałej, ρ_c średnią gęstością protonową części rozpuszczalnej matrycy stałej, a $\alpha_{H_2O}, \alpha_{cd}$ są współczynnikami proporcjonalności pozwalającym przeliczyć masę

mnożoną przez gęstość protonową na sygnał MRJ, odpowiednio dla molekuł wody oraz dla części matrycy stałej, która uległa rozpuszczeniu. Współczynniki te mogą różnić się od jedynki na przykład w obecności jonów paramagnetycznych w środowisku.

Sygnał S pochodzący od części stałej próbki może być opisany jako:

$$S = \alpha_s \rho_s m_0 - \alpha_{cu} \rho_c m_{cd}, \quad (3.105)$$

gdzie m_0 jest sucha masa próbki, ρ_s - średnią gęstością protonową nierozpuszczalnej matrycy stałej, α_s , α_{cu} - współczynnikami proporcjonalności dla części nierozpuszczalnej matrycy stałej oraz dla części matrycy stałej, która uległa rozpuszczeniu.

Ilość rozpuszczonej frakcji stałej zależy od średniego stężenia nasycenia (rozpuszczeniowego) c_s dla rozpuszczalnej części stałej, bowiem:

$$c_s = \frac{m_{cd}}{\Delta m + m_{cd}}. \quad (3.106)$$

Pozwala to na wyznaczenie masy części rozpuszczalnej matrycy stałej:

$$m_{cd} = \frac{c_s}{1 - c_s} \Delta m. \quad (3.107)$$

Dokonując podzielenia związku (3.104) przez (3.105) oraz podstawienia (3.107), po przekształceniach otrzymać można:

$$L/S(\Delta m/m_0) = k \cdot \frac{\left(1 + \gamma \frac{c_s}{1 - c_s}\right) \Delta m/m_0}{1 - \frac{\gamma}{\delta} \frac{c_s}{1 - c_s} \cdot \Delta m/m_0}, \quad (3.108)$$

przy czym w równaniu (3.100) dokonano podstawień: $\gamma = \frac{\rho_c}{\rho_{H_2O}}$, $\delta = \frac{\rho_s}{\rho_{H_2O}}$ $k = \frac{\alpha_{H_2O} \rho_{H_2O}}{\alpha_s \rho_s}$.

Jeśli założyć, że w próbce występują dwa rodzaje wody, a mianowicie woda ściśle i woda luźno związana, wówczas sygnał cieczowy opisany równaniem (3.104) można rozdzielić na:

$$L = L_1 + L_2, \quad (3.109)$$

co prowadzi do:

$$L = L_0 + \left(\alpha_{H_2O} \rho_{H_2O} + \alpha_{cd} \rho_c \frac{c_s}{1 - c_s} \right) \Delta m_1 + \left(\alpha_{H_2O} \rho_{H_2O} + \alpha_{cd} \rho_c \frac{c_s}{1 - c_s} \right) \Delta m_2, \quad (3.110)$$

Jeśli jedna z pul wód jest ściśle związana, wówczas szybko ulega wysyceniu i można przyjąć,

że $\Delta m_1 = m_1$ i wtedy:

$$\frac{L_1}{L} = \frac{m_1}{m_1 + \left(1 + \gamma \frac{c_s}{1 - c_s} \right) \cdot (\Delta m - m_1)}, \quad (3.111)$$

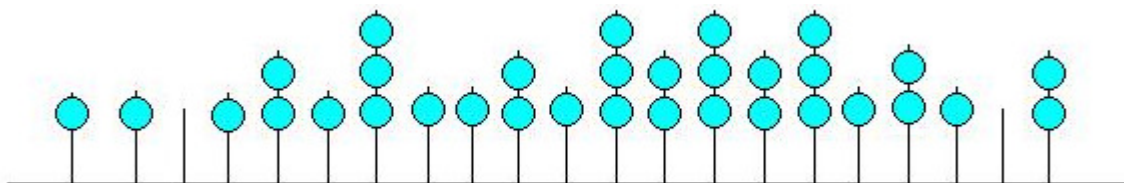
Jak wynika z formuł (3.108) oraz (3.111) badając hydratacyjne zależności sygnału $^1\text{H-MRJ}$ można wyznaczyć średnie stężenie nasycenia substancji rozpuszczających się w próbce.

4. Izoterma sorpcyjna

Izoterma sorpcyjna opisuje zależność masy wody adsorbowanej przez próbkę w funkcji wilgotności względnej otoczenia. Pierwsze próby ilościowego opisu procesu adsorpcji wody na powierzchniach podejmowane były już na początku XX wieku przez Langmuira [Langmuir, 1918]. Założył on jednowarstwową sorpcję molekuł wody na powierzchni absorbenta. Krzywa Langmuira poprawnie opisywała zachowanie układu dla wilgotności względnych $h < 0.1$. Rozszerzenie modelu zostało zaproponowane w 1938 r. przez Brunauera, Emetta i Tellera. Wyróżnili oni pierwotne i wtórne miejsca wiążące wodę, zakładając, że miejsca wtórne wypełnione są w tym samym stopniu. Model ten prawidłowo opisuje dane doświadczalne dla wilgotności względnych nie większych niż $h = 0.4$. Najogólniejszy model został zaproponowany przez Denta w 1977 roku. Z uwagi, że jest on najbardziej ogólny z wszystkich wymienionych, zostanie przedstawione jego szczegółowe wyprowadzenie.

4.1. Model Denta

Model ten wyróżnia dwa rodzaje miejsc wiążących molekuły adsorbentu: pierwotne – molekuły wody wiążą się bezpośrednio do powierzchni adsorbentu, oraz wtórne miejsca wiążące – molekuły wody wiążą się do innych molekuł, wcześniej już związanych (Rys. 4.1).



Rys. 4.1. Przyłączanie się molekuł wody do adsorbenta wg modelu Denta.

Jeśli przez N oznaczyć liczbę wszystkich miejsc wiążących, a przez S_0 liczbę tych, do których nie zaadsorbowana została żadna molekula, S_1 liczbę tych, do których zaadsorbowała jedna molekula, a ogólnie S_i to liczba miejsc wiążących, do których zaadsorbowanych zostało i molekuł, wówczas:

$$S_0 + S_1 + S_2 + \dots = N. \quad (4.1)$$

Niech ap oznacza szybkość wiązania molekuł (a – współczynnik przyłączania, p – ciśnienie atmosferyczne), C_0 szybkość ucieczki molekuł z pierwotnych miejsc wiążących, a C szybkość ucieczki z miejsc wtórnych. Zakładając warunki równowagi termodynamicznej ($\frac{dS_0}{dt} = \frac{dS_1}{dt} = \frac{dS_2}{dt} = \dots = 0$), oraz wykorzystując warunek (4.1) otrzymuje się układ równań:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{N} \frac{dS_0}{dt} = C_0 \frac{S_1}{N} - ap \frac{S_0}{N} = 0 \end{array} \right. \quad (4.2a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{N} \frac{dS_1}{dt} = C \frac{S_2}{N} - ap \frac{S_1}{N} - C_0 \frac{S_1}{N} + ap \frac{S_0}{N} = 0 \end{array} \right. \quad (4.2b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{N} \frac{dS_2}{dt} = C \frac{S_3}{N} - ap \frac{S_2}{N} - C \frac{S_2}{N} + ap \frac{S_1}{N} = 0 \end{array} \right. \quad (4.2c)$$

...

który pozwala na wyznaczenie liczby miejsc wiążących i molekuł w zależności od S_0 , bowiem:

$$\frac{S_1}{N} = \frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N} \quad (4.3a)$$

$$\frac{S_2}{N} = \frac{a}{C} \frac{a}{C_0} p^2 \frac{S_0}{N} \quad (4.3b)$$

$$\frac{S_3}{N} = \left(\frac{a}{C} \right)^2 \frac{a}{C_0} p^3 \frac{S_0}{N} \quad (4.3c)$$

...

gdzie równanie (4.3a) powstaje z przekształcenia (4.2a), równanie (4.3b) z przekształcenia (4.2b) i dokonania podstawienia z równania (4.3b) itd.

Prowadzi to do zależności:

$$\frac{S_i}{N} = \left(\frac{a}{C} \right)^{i-1} \frac{a}{C_0} p^i \frac{S_0}{N}. \quad (4.4)$$

Zakładając, że i jest bardzo duże, wówczas – przy wykorzystaniu warunku (4.1):

$$\frac{S_0}{N} = 1 - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{S_i}{N}. \quad (4.5)$$

Ponieważ $\sum_{i=1}^{\infty} \frac{S_i}{N}$ jest sumą szeregu geometrycznego, więc:

$$\frac{S_0}{N} = \frac{1 - \left(\frac{a}{C}\right)p}{1 + \left(\frac{a}{C_0}\right)p - \left(\frac{a}{C}\right)p}. \quad (4.6)$$

Liczba wszystkich zaadsorbowanych molekuł wynosi:

$$I = \sum_{i=1}^{\infty} i \cdot S_i \quad (4.7)$$

Średnia liczba molekuł $\bar{S}$ przypadająca na jedno miejsce wiążące może być wyrażona jako:

$$\bar{S} = \frac{I}{N}. \quad (4.8)$$

Wyrażenie (4.8) jest sumą nieskończonej ilości wyrazów ciągu arytmetyczno-geometrycznego:

$$\bar{S} = \sum_{i=0}^{\infty} i \frac{S_i}{N} = \frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N} \left[1 + 2\left(\frac{a}{C}\right)p + 3\left(\frac{a}{C}\right)^2 p^2 + 4\left(\frac{a}{C}\right)^3 p^3 + \dots \right], \quad (4.9)$$

co prowadzi do:

$$\bar{S} = \left(\frac{a}{C_0}\right)p \left(\frac{S_0}{N}\right) \frac{1}{\left[1 - \left(\frac{a}{C}\right)p\right]^2}. \quad (4.10)$$

Wykorzystując zależność (4.6):

$$\bar{S} = \frac{\left(\frac{a}{C_0}\right)p}{\left[1 - \left(\frac{a}{C}\right)p\right] \left[1 + \left(\frac{a}{C_0}\right)p - \left(\frac{a}{C}\right)p\right]}. \quad (4.11)$$

Wprowadzając oznaczenia: $h = \frac{p}{p_0}$, $b_1 = \frac{a}{C_0} p_0$, $b = \frac{a}{C} p_0$:

$$\bar{S} = \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)} . \quad (4.12)$$

Średnią liczbę molekuł przypadającą na jedno miejsce wiążące można zapisać przy pomocy równania (4.8) lub odwołać się bezpośrednio do masy zaadsorbowanej wody. Liczba wszystkich zaadsorbowanych molekuł I jest proporcjonalna do całkowitej masy wody zaadsorbowanej Δm , a liczba miejsc wiążących N do masy wody, ΔM która wysyciłaby pierwotne miejsca wiążące , wobec tego:

$$\bar{S} = \frac{I}{N} = \frac{\Delta m}{\Delta M} = \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)} . \quad (4.13)$$

Przekształcając powyższe równanie (4.13) oraz normalizując do suchej masy adsorbenta m_0 otrzymuje się równanie izotermy sorpcyjnej Denta:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)} . \quad (4.13)$$

Należy zauważyć, że na mocy równania (4.4) stosunek ilości miejsc wiążących $i+1$ molekuł do ilości miejsc wiążących i molekuł wody ($i \geq 1$) dany jest przez:

$$\frac{S_{i+1}}{S_i} = \frac{\left(\frac{a}{C}\right)^i \frac{a}{C_0} p^{i+1} \frac{S_0}{N}}{\left(\frac{a}{C}\right)^{i-1} \frac{a}{C_0} p^i \frac{S_0}{N}} = \frac{a}{C} p \quad (4.14)$$

Z kolei stosunek liczby miejsc, do których nie jest związana żadna molekula do liczby miejsc, do których została związana jedna molekula, na podstawie równania (4.3a) wynosi:

$$\frac{S_0}{S_1} = \frac{\frac{S_0}{N}}{\frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N}} = \frac{C_0}{ap} \quad (4.15)$$

Gdy wilgotność względna $h = 1$, wówczas $p = p_0$ i równania (4.14) i (4.15) są dane przez:

$$\left. \frac{S_{i+1}}{S_i} \right|_{h=1} = \frac{a}{C} p_0 = b \quad (4.16)$$

oraz:

$$\left. \frac{S_0}{S_1} \right|_{h=1} = \frac{C_0}{ap_0} = \frac{1}{b_1} \quad (4.17)$$

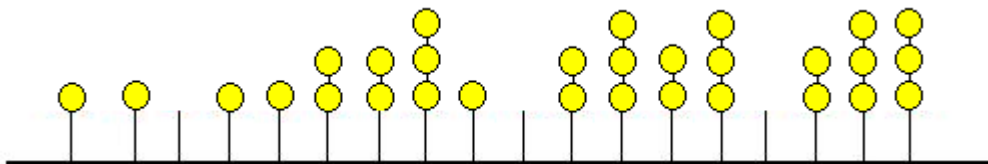
W modelu zaproponowanym przez Denta, parametr b jest stosunkiem szybkości przyłączania molekuł wody do szybkości ich odłączania dla miejsc, do których związana jest przynajmniej jedna molekula w warunkach nasycenia ($h = 1$). Jednocześnie jest to stosunek liczby miejsc wiążących $i+1$ molekuł do liczby miejsc wiążących i molekuł. Dent założył, że stosunek ten jest stały dla każdego $i \geq 1$. Z kolei odwrotność parametru b_1 wyraża stosunek liczby nieobsadzonych miejsc, do liczby miejsc wiążących jedną molekułą i jest miarą hydrofobowości powierzchni wiążących.

4.2 Model BET

Model wiązania molekuł adsorbentu do powierzchni adsorbentu zaproponowany przez Brunauera, Emetta i Tellera zakłada, że w warunkach nasycenia szybkość wiązania molekuł ap_0 i szybkość ich odłączania, C , od wtórnych miejsc wiążących jest taka sama [(patrz (4.2))], co prowadzi do wniosku, że stosunek liczby miejsc wiążących $i+1$ molekuł wody do miejsc wiążących i molekuł wody wynosi $b = 1$, co oznacza, równość liczby S_{i+1} i S_i .

Prowadzi to, po położeniu w równaniu (4.13) $h = 1$ do równania izotermy BET:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-h)(1+b_1 h-h)} \quad (4.18)$$

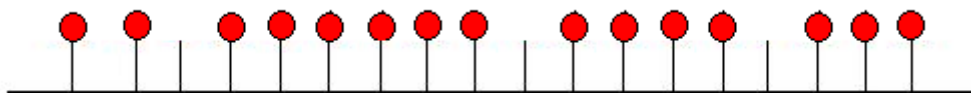


Rys. 4.2. Przyłączanie się molekuł wody do adsorbenta wg modelu BET.

4.3. Model Langmuira

Pierwszy matematyczny model opisujący wiązanie molekuł adsorbentu do powierzchni adsorbenta zakładał jednowarstwowość - istnienie jedynie pierwotnych miejsc wiążących, co oznacza, że molekuły mogły się wiązać jedynie do powierzchni adsorbenta. Równanie izotermy sorpcyjnej Langmuira można otrzymać poprzez położenie $b = 0$ w równaniu (4.13):

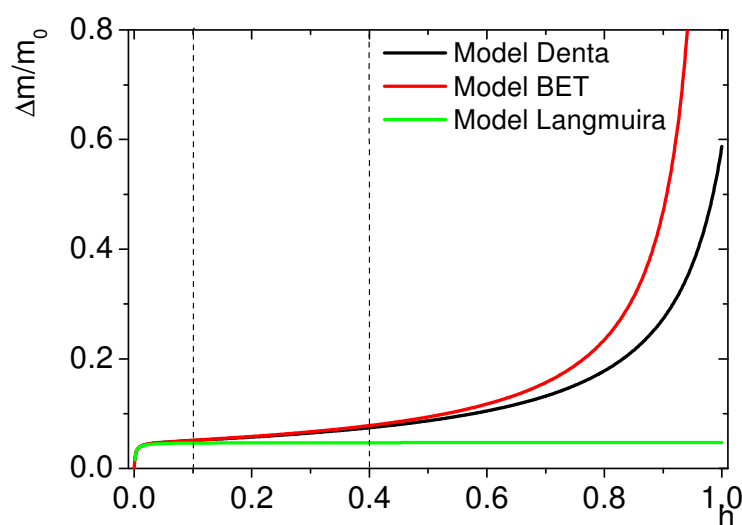
$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{1 + b_1 h} \quad (4.19)$$



Rys. 4.3. Przyłączanie się molekuł wody do adsorbenta wg modelu Langmuira.

4.4. Porównanie modeli Langmuira, BET i Denta

Rysunek 4.4 przedstawia wynik symulacji pokazujące różnice między modelami opisującymi proces przyłączania się molekuł wody do adsorbenta. Jak już wspomniano, model Langmuira jest najprostszym modelem, który poprawnie opisuje ten proces dla niskich poziomów wilgotności względnej, w której następuje proces adsorpcji. Różnice między modelem zaproponowanym przez Brunauera, Emetta i Tellera, a najogólniejszym modelem Denta stają się widoczne dla poziomów wilgotności względnej wyższych niż 40%.



Rys. 4.4. Symulacja porównująca modele Langmuira, BET i Denta izotermę sorpcyjnej. Do symulacji użyto parametrów o wartościach: $\Delta M/m_0 = 0.047$, $b = 0.95$, $1/b_1 = 0.002$ ($b_1 = 500$).

4.5 Forma paraboliczna izotermę sorpcyjnej

Dane doświadczalne zależności zaadsorbowanej masy wody w jednostkach suchej masy od wilgotności względnej otoczenia często przestawia się w formie parabolicznej. Dzielnąc h przez równanie (4.13) otrzymuje się:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + B \cdot h - C \cdot h^2 \quad (4.20)$$

gdzie: A , B , C są współczynnikami izotermę sorpcyjnej Denta wyrażonej w formie parabolicznej, związane ze współczynnikami w formie sigmoidalnej następująco:

$$A = \frac{1}{\frac{\Delta M}{m_0} b_1} \quad (4.21a)$$

$$B = \frac{b_1 - 2b}{\frac{\Delta M}{m_0} b_1} \quad (4.21b)$$

$$C = \frac{b_1 b - b^2}{\frac{\Delta M}{m_0} b_1} \quad (4.21c)$$

Transformacja odwrotna do (4.21) pozwalająca wyliczyć współczynniki izoterm sorpcyjnej Denta w formie sigmoidalnej na podstawie znanych współczynników w formie parabolicznej ma postać:

$$\frac{\Delta M}{m_0} = \frac{1}{\sqrt{B^2 + 4AC}} \quad (4.22a)$$

$$b = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC} - B}{2A} \quad (4.22b)$$

$$b_1 = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC}}{A} \quad (4.22c)$$

W przypadku modelu BET, w równaniach transformacyjnych (4.21) i (4.22) należy położyć $b = 1$, co sprowadza się do warunku:

$$B = C - A \quad (4.23)$$

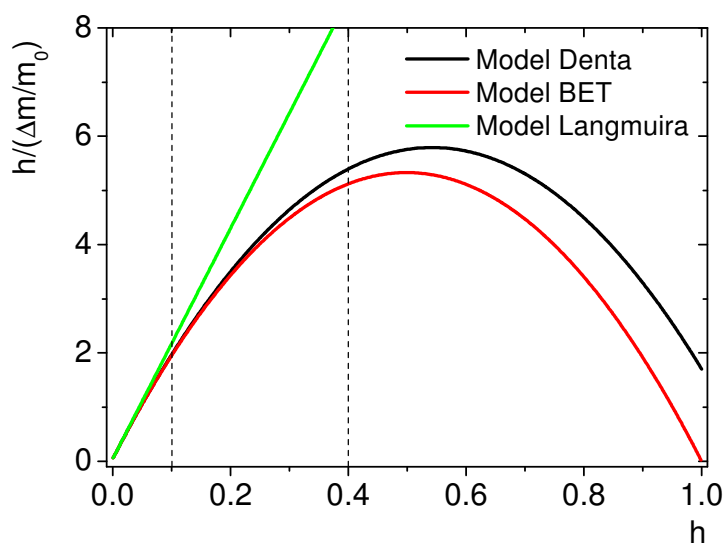
i prowadzi do równania izoterm BET w formie parabolicznej:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + (C - A) \cdot h - C \cdot h^2 \quad (4.24)$$

W przypadku monowarstwy Langmuira danych nie przedstawia się w tej formie, bowiem warunek $b = 0$, na podstawie (4.22b), oznacza, że $C = 0$, co sprowadza się do liniowej zależności $\frac{h}{\Delta m / m_0}(h)$ (rysunek 4.5):

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + B \cdot h \quad (4.25)$$

Porównanie teoretycznych krzywych danych równaniami (4.20), (4.24) i (4.25) przedstawia Rysunek 4.5.



Rys. 4.5. Symulacja porównująca modele Langmuira, BET i Denta dla danych przedstawionych w formie parabolicznej. Do symulacji użyto parametrów o wartościach: $\Delta M/m_0 = 0.047$, $b = 0.95$, $1/b_1 = 0.002$ ($b_1 = 500$)

Wszystkie krzywe przechodzą przez punkt o współrzędnych $(0, A)$, natomiast cechą charakterystyczną krzywej opisującej model BET jest to, że przechodzi ona również przez punkt o współrzędnych $(1,0)$ – jej maksimum przypada na wilgotność względną $h = 0.5$.

III. METODY BADAŃ

5. Materiały i metody

5.1. Próbki

Zmierzono plechę grzyba zlicznizowanego *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. pochodzącego z siedlisk na wyspach Archipelagu Szetlandów Południowych, Antarktyda Oceaniczna. Analizowano trzy grupy próbek:

- (i) plech zebranych na Wyspie Króla Jerzego w 1987 r., a wykorzystanych do pomiarów temperaturowych $^1\text{H-MRJ}$ w domenie czasu dla niskich zakresów uwodnień ($\Delta m/m_0 = 0.039 - 0.199$, gdzie Δm to masa wody związanej w plesze, zaś m_0 to sucha masa plechy),
- (ii) plech pochodzących z Wyspy Pingwinów, zebranych w 2009 r. – wykorzystanych w pomiarach temperaturowych $^1\text{H-MRJ}$ w domenie czasu dla uwodnień w zakresie $\Delta m/m_0$ od 0.499 do 0.964, w pomiarach temperaturowych w domenie częstości oraz w pomiarach hydratacyjnych, kalorymetrii różnicowej, skaningowej mikroskopii elektronowej, kalorymetrii czynnościowej, wreszcie aktywności fotosyntetycznej.
- (iii) plech zebranych na Wyspie Króla Jerzego w 2009 r. w dzień pochmurny i dzień słoneczny – wykorzystywanych w badaniu procesów związanych z wpływem poziomu fotosyntezy na rozpuszczanie frakcji stałej plechy.

Przed pomiarami materiał przechowywany był w zielniku Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Poziom uwodnienia plech wyznaczany był grawimetrycznie przy użyciu wagi RADWAG, typ WAX 110 (dokładność skali 0.00001 g).

Suchą masę plech wyznaczono poprzez prażenie ich w temperaturze 70°C przez 72 h. Z uwagi na możliwość dekompozycji materiału badawczego, wyższe temperatury prażenia nie były używane [Gaff, 1977].

5.1.1. Oznaczenie żywotności próbek

Testy żywotności wykonane zostały przy użyciu błękitu metylenowego. Wykonano przekroje poprzeczne plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* i barwiono je 3 minuty w roztworze alkoholowym błękitu metylenowego. Następnie, z wykorzystaniem mikroskopu optycznego (powiększenie 500 razy) obserwowano zabarwienie komórek komponentu glonowego. Komórki żywe nie są barwione (barwnik przenikający do wnętrza komórek jest usuwany przez mechanizmy obronne komórek). Wybarwiają się natomiast komórki martwe, u których takie mechanizmy nie działają. Dla każdego okazu analizowano po trzy przekroje z różnych miejsc plechy, w każdym zliczając minimum 100 komórek. Dokładna liczba analizowanych komórek zależała od obfitości ich występowania w danym fragmencie plechy.

5.2. Metody badawcze

5.2.1. Kinetyka hydratacji i dehydratacji, izoterma sorpcyjna

Kinetykę dehydratacji plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* prowadzono w temperaturze pokojowej nad powierzchnią żelu krzemionkowego, rejestrując ubytek masy w funkcji czasu.

Kinetykę hydratacji prowadzono w temperaturze pokojowej z fazy gazowej w eksykatorach nad nasyconymi roztworami wybranych związków chemicznych lub wody. Wilgotność względna środowiska była określona rodzajem substancji (Tabela 5.1).

substancja	$h = p/p_0$	substancja	$h = p/p_0$
H ₃ PO ₄	0.09	Na ₂ S ₂ O ₃	0.76
CaCl ₂	0.32	K ₂ CrO ₃	0.88
K ₂ CO ₃	0.44	Na ₂ SO ₄	0.93
Na ₂ Cr ₂ O ₇	0.52	K ₂ SO ₄	0.97
NH ₄ NO ₃	0.63	H ₂ O	1

Tabela 5.1. Wilgotności względne nad powierzchniami przesyconych roztworów wybranych substancji.

5.2.2 Pomiary w MRJ w domenie czasu

5.2.2.1 Relaksometr

Pomiary MRJ w domenie czasu zostały wykonane przy użyciu relaksometru impulsowego HB65 Waterloo NMR Spectrometers, Waterloo, Ontario, Kanada, pracującym na częstotliwości 30 MHz, w polu magnetycznym o wartości indukcji pola magnetycznego $B_0 = 0.7$ T. Moc stosowanych impulsów $\pi/2$ wynosiła 400 W i pozwoliła zaobserwować sygnał zaniku swobodnej precesji pochodzący od protonów ciała stałego jak i protonów ciekłych.

Pomiary sygnału zaniku swobodnej precesji wykonano stosując pojedynczy impuls $\pi/2$ o długości 1.5 μ s. Czas martwy spektrometru wynosił 9.8 μ s, a czas repetycji 2.003 s. Każda seria pomiarów składała się ze 120 punktów pomiarowych (9.8 – 1430 μ s), które zostały podzielone na trzy grupy:

- (i) 9.8 – 25 μ s, 40 punktów, z odstępem czasowym 0.4 μ s,
- (ii) 25 – 225 μ s, 40 punktów, z odstępem czasowym 5 μ s,
- (iii) 225 – 1430, 40 punktów, z odstępem czasowym 30 μ s.

W przypadku pomiarów hydratacyjnych wynik pomiaru był uśrednieniem 2000 akwizycji i trwał 68 minut, natomiast w przypadku pomiarów temperaturowych – 1000 akwizycji (34 minuty).

W pomiarach *solid echo* stosowano sekwencję dwóch przesuniętych w fazie o 90° impulsów $\pi/2$. Odstęp między nimi wynosił 15 μ s. Wynik pomiaru był uśrednieniem 1000 akwizycji.

5.2.2.2. Schemat blokowy relaksometru

Spektrometr MRJ, oprócz magnesu wytwarzającego pole $\vec{B}_0$, składa się z toru nadawczego oraz toru odbiorczego. Tor nadawczy generuje impulsowe siły elektromotoryczne, natomiast tor odbiorczy rejestruje odpowiedź próbki. Głowica pomiarowa jest elementem łączącym oba tory. Rysunek 5.1 przedstawia schemat blokowy relaksometru. Poniżej opisano najważniejsze bloki.

K1: Generator częstotliwości. Jest odpowiedzialny za wytworzenie częstotliwości nośnej i jej stabilizację. Ze źródła sygnału sinusoidalnego podawana jest częstotliwość z zakresu 85 – 145 MHz. Układ odpowiedzialny jest za odjęcie od niej 80 MHz i stabilizację.

K6. Przesuwnik fazowy. Zmienia w żądany sposób fazę sygnału początkowego.

K2. Programator impulsów. Sumuje sygnały z bloków K1 i K5 przez co wytwarza impulsy pomiarowe.

K3: Filtr częstotliwości. Jest odpowiedzialny za odcinanie składowych harmoniczných, które mogłyby być wzmocnione przez wzmacniacz mocy.

K4: Wzmacniacz mocy impulsów.

Przedwzmacniacz: Po dokonaniu pomiaru sygnał jest wstępnie wzmacniany. Przedwzmacniacz, przy pomocy bloku *Matching*, dopasowuje impedancję wyjścia wzmacniacza do wejścia głowicy pomiarowej w taki sposób, aby eliminować odbicia mocy sygnału. Jest to także element oddzielający tor nadawczy od toru odbiorczego.

Głowica pomiarowa. Łączy tor nadawczy i odbiorczy. Jej główny element, to cewka, wewnątrz której umieszczana jest badana próbka.

K7: Wzmacniacz sygnału. Element odejmujący częstotliwość nośną i wzmacniający sygnał. Użytkownik, przy pomocy bloku GAIN, ustala odpowiednią wielkość wzmocnienia sygnału.

Phase Diode: Układ detekcji diodowej używany do dokładnego strojenia impulsów π . Z uwagi na nieliniowość, nie jest wykorzystywany do pomiarów.

K9: Filtr dolnoprzepustowy. Przygotowuje sygnał do wyjścia.

5.2.2.3 Regulator temperatury

Regulację i stabilizację temperatury uzyskano przy pomocy regulatora UNIPAN 650. Jego schemat blokowy został przedstawiony na Rysunku 5.2. Na podstawowe elementy regulatora składają się: mostek oporowy, wzmacniacz pomiarowy, układ korekcyjny PID oraz tyrystorowy wzmacniacz mocy.

Mostek. Zasilany napięciem zmiennym wytworzonym przez generator. Składa się z dwóch gałęzi - platynowego czujnika pomiarowego, pracujący w zakresie temperatur $-200 - 500^{\circ}\text{C}$. umieszczonego przy próbce oraz nastawy temperatury przyjmującej różne wartości rezystancji ustalonej przy pomocy trzech przełączników wyskalowanych w $^{\circ}\text{C}$. Inna niż zadana temperatura układu powoduje pojawienie się napięcia na przekątnej mostka, które jest wzmacniane, poddane korekcji PID i wykorzystane, by sterować mocą grzejną termostatu. Czułość mostka wynosi $0.4 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$.

Wzmacniacz pomiarowy regulatora. Składa się z trzech elementów: wzmacniacza prądu zmiennego, prostownika (synchronizacja przy pomocy generatora) i wzmacniacza prądu

stałego. Wzmocnienie układu regulowane jest przez użytkownika za pomocą pokręteł znajdujących się na płycie czołowej.

Miernik wychyłowy. Służy śledzeniu zmian temperatury próbki. Wskazówka miernika może poruszać się między dwoma skrajnymi położeniami oddalonymi o dziesięć jednostek od położenia równowagi (temperatura termostatu równa temperaturze zadanej). Wychył wskazówki równoznaczny jest z niezrównoważeniem mostka i uruchomieniem pętli sprzężenia zwrotnego mającego na celu obniżenie lub podniesienie temperatury termostatu. Dostępne są cztery zakresy czułości C , przy których wychylenie wskazówki o dziesięć jednostek odpowiada różnicy temperatur

$$\Delta T = \pm \frac{20000}{K_p} \cdot C \quad (5.1)$$

od zadanej. Zakresy czułości to $C = 1^\circ\text{C}$; 0.1°C , 0.01°C lub 0.001°C , a K_p jest całkowitym wzmocnieniem.

Układ PID. Jest układem korekcyjnym, którego sygnał wyjściowy stanowi suma sygnałów proporcjonalnych do błędu regulacji (P), całki błędu regulacji (I) i pochodnej sygnału błędu regulacji:

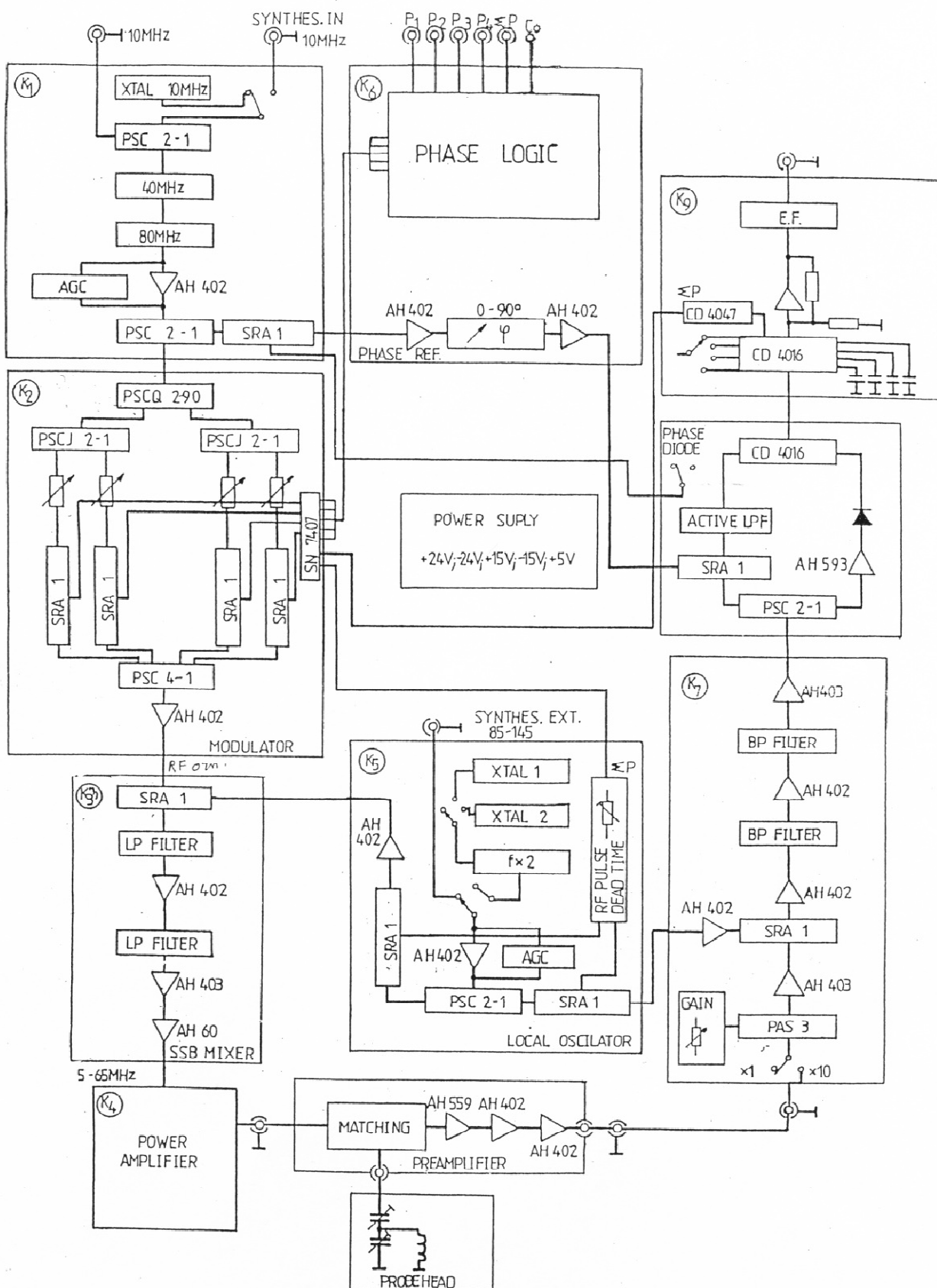
$$P + I + D = E(t) + \frac{1}{T_i} \int E(t) dt + T_d \frac{dE(t)}{dt}, \quad (5.2)$$

gdzie $E(t)$ jest sygnałem błędu regulacji, T_i – czasem całkowania, a T_d – czasem różniczkowania. Odpowiednie ustalenie czasu całkowania i różniczkowania, co przekłada się na określony stosunek P, I i D, dobierane jest dla konkretnego typu termostatu.

Tyristorowy wzmacniacz mocy regulatora. Umożliwia zmianę mocy grzejnika w zakresie od 0 do 150 W (gdy opór grzejnika R wynosi 19Ω) lub $0 - 2500 \text{ V} / R$, gdy opór ten jest większy.

Podczas wykonywania pomiarów temperaturowych w domenie czasu wzmocnienie wzmacniacza pomiarowego miało wartość $K_p = 1600$, a zakres czułości miernika wychyłowego: $C = 0.01^\circ\text{C}$. Dokładność pomiaru temperatury, według formuły (5.1), wynosi $\Delta T = \pm 0.125^\circ\text{C}$ dla pełnego zakresu pomiarowego.

Badane plechy grzybów zlichenizowanych ochładzane były w strumieniu par ciekłego azotu, którego tempo odparowywania regulowano przy pomocy wewnętrznej grzałki umieszczonej w dewarze. Strumień gazu był ogrzewany do żądanej temperatury przy pomocy stabilizowanej przez regulator temperatury UNIPAN 650 grzałki.



Rys. 5.1. Schemat blokowy regulatora spektrometru impulsowego HB56.

5.2.3 Pomiary w domenie częstości

Pomiary w domenie częstości zostały wykonane przy użyciu spektrometru Bruker Avance III, OneBay, Bruker Biospin. Częstotliwość pracy dla protonów wynosi 300.14 MHz. W skład układu pomiarowego wchodzi także: magnes nadprzewodzący typu *wide bore*



(średnic otworu 89 mm) o wartości indukcji pola magnetycznego $B_0 = 7$ T, głowica pomiarowa wysokiej mocy na zakresy ^{19}F – ^1H i ^{15}N – ^{31}P , stacja robocza z oprogramowaniem TopSpin 3.0 dostarczoną przez producenta, a także regulator temperatury. Tak wyposażony system umożliwia pomiary zarówno w domenie częstości (rejestracja widm MRJ), jak i w domenie czasu (pomiary relaksacyjne) dla wszystkich najważniejszych nuklidów obecnych w układach biologicznych, w tym: ^1H , ^2D , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na czy ^{31}P .

Rys. 5.3. Spektrometr Bruker Avance III.

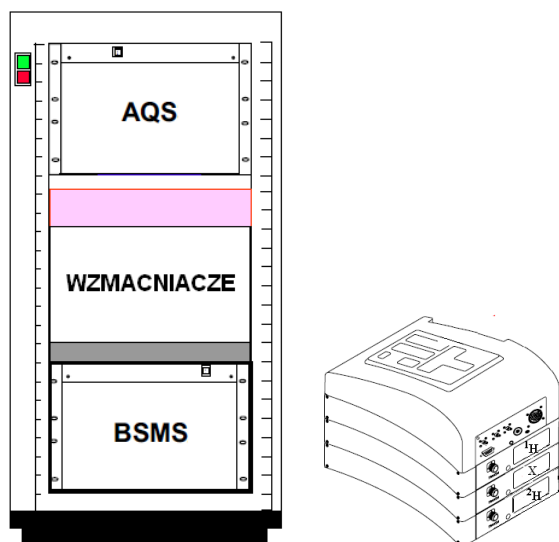
Wszechstronne oprogramowanie eksperymentu MRJ najnowszej generacji pozwala na używanie wszystkich powszechnie stosowanych metod impulsowych MRJ. Wysoka moc impulsu umożliwia badania obiektów biologicznych zarówno o naturze ciała stałego jak i cieczy w szerokim zakresie temperatur.

Pomiary widm ^1H -NMR wykonano przy użyciu impulsu $\pi/2$ o mocy 400 W i czasie trwania od 1.7 do 2.1 μs . Czas repetycji wynosił 2 s. Każde widmo powstało z 40 akwizycji. Łączny czas pomiaru wyniósł około 2 minut.

5.2.3.1 Spektrometr

AQS (Blok kontroli akwizycji, *Acquisition Control System*): Część SGU (*Signal Generate Unit*) bloku odpowiedzialna jest za generowanie impulsów częstotliwości radiowych wykorzystywanych do pobudzenia próbki, a część DRU (*Digital Receiver Unit*) za odbieranie i wzmocnienie sygnałów z badanej próbki.

System wzmacniaczy: wzmacnia generowany przez jednostkę SGU sygnał.



Rys. 5.4. Schemat ukazujący spektrometr z podziałem na poszczególne jednostki oraz zewnętrzny przedwzmacniacz HPPR.

HPPR (Przedwzmacniacz wysokiej wydajności, *High Performance Preampfilar*):

Zadaniem jednostki jest transmisja i filtracja uprzednio wygenerowanego i wzmocnionego przez system wzmacniaczy sygnału do cewki nadawczo – odbiorczej (tor nadawczy), w której umieszczona jest badana próbka. Wzmacnia także sygnał generowany przez próbkę po pobudzeniu jej odpowiednimi impulsami (tor odbiorczy).

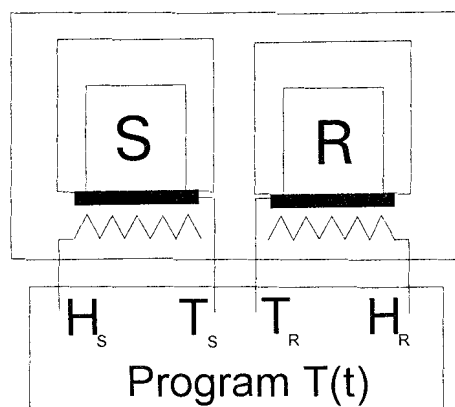
BSMS (System kontroli magnetycznej, *Bruker Smart Magnet System*): jednostka odpowiedzialna za utrzymanie stałego pola magnetycznego – stabilizację i kompensowanie jego niejednorodności. Stałe pole magnetyczne o wartości indukcji $B_0 = 7 \text{ T}$ wytwarzane jest przez magnes nadprzewodzący pracujący w temperaturze ciekłego helu (około $-270 \text{ }^{\circ}\text{C}$). W celem izolacji termicznej między otoczeniem a magnesem stosuje się warstwę ciekłego azotu (o temperaturze wynoszącej około -196°C).

5.2.3.2 Regulacja temperatury

Za regulację temperatury odpowiedzialna jest jednostka VTU (*Variable Temperature Unit*). Właściwą część układu regulującego temperaturę stanowi termopara pełniąca funkcję termometru, grzałka oraz linia azotowa – z wbudowaną grzałką wewnętrzną zwiększającą szybkość parowania azotu (element chłodniczy). Układ pracuje w sprzężeniu zwrotnym regulowanym przez VTU, która jest kontrolowana z poziomu programu TopSpin 3.0.

5.2.4. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Pomiary kalorymetryczne plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zostały wykonane przy użyciu kalorymetru różnicowego DSC Pyrys 1, PerkinElmer. Jest to kalorymetr kompensacyjny, w którym istotą pomiarów jest rejestracja mocy elektrycznej potrzebnej do utrzymania zerowej różnicy temperatur między dwoma podukładami: mierzonej próbki S (*sample*) oraz odniesienia R (*reference*). Układem odniesienia jest wzorzec – substancja, która w badanym przedziale temperatur nie ma przejść fazowych lub – jak w przeprowadzonych pomiarach – puste naczynko kalorymetryczne. Na każdy z podukładów S i R składa się: aluminiowy pojemnik wypełniony odpowiednio próbką i wzorcem, platynowy termometr oporowy oraz grzejnik.



Rys. 5.5. Uproszczony schemat kompensacyjnego kalorymetru DSC [Wróbel, Marzec, 2006].

Różnica chwilowej mocy dostarczanej próbce oraz wzorcowi w zależności od temperatury jest krzywą DSC. Jeśli w badanym zakresie temperatur próbka nie ma przejść fazowych, utrzymanie stałej temperatury między układami S i R nie wymaga nakładu dodatkowej energii, poza tą wynikającą z różnych pojemności cieplnych próbki i wzorca. Jeśli natomiast badana próbka ma przejście fazowe, wiąże się to z silną zmianą mocy grzałki próbki lub wzorca (w zależności od kierunku zmian temperatury), objawiającą się pikiem na krzywej DSC. Pole powierzchni pod pikiem jest proporcjonalne do entalpii przejścia fazowego na jednostkę masy, ΔH :

$$\Delta H = \int_{T_A}^{T_B} \frac{dW}{dt} \frac{dt}{dT} dT = k \cdot \int_{T_A}^{T_B} \frac{dW}{dt} dT = kA, \quad (5.3)$$

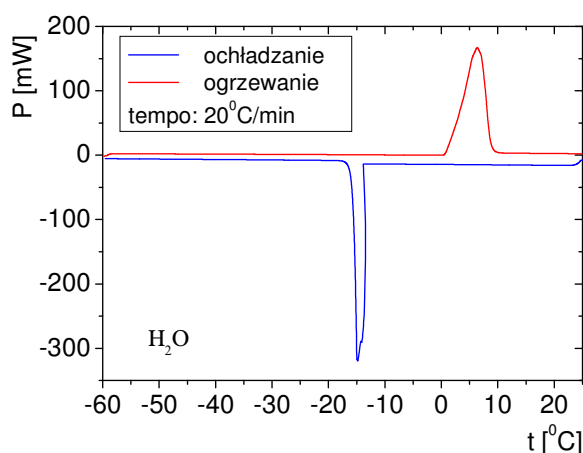
gdzie: $\frac{dW}{dt}$ jest chwilową różnicą dostarczanej mocy na jednostkę masy między układami S i

R, $k = \frac{dt}{dT}$ odwrotnością zadanej, stałej szybkości zmian temperatury, $A = \int_{T_A}^{T_B} \frac{dW}{dt} dT$

powierzchnią pod pikiem DSC, T_A , T_B – temperaturami, między którymi zaobserwowano silną zmianę mocy grzewczej. W prowadzonych pomiarach masa pojedynczej próbki wynosiła od 7.8 mg do 8.1 mg. Niepewność wyznaczenia temperatury nie przekraczała 0.5%. Błąd wartości entalpii nie był większy niż 2% [Mikułko, 2006].

5.2.4.1 Skalowanie kalorymetru

Wykonano pomiar kontrolny dla kropli wody destylowanej o masie 4 mg (Rys. 5.6).



Rys. 5.6. Skalowanie kalorymetru DSC. Ochładzanie (krzywa niebieska) i ogrzewanie (krzywa czerwona) próbki wody destylowanej.

Pomiary DSC dla wody destylowanej ujawniły dla ogrzewania obecność piku o centrum w temperaturze 6.3°C i onsecie 0.6°C. W przypadku ochładzania kropla wody uległa przechłodzeniu do temperatury -14°C.

5.2.5 Mikroskopia elektronowa

W mikroskopii elektronowej naświetla się próbkę wiązką elektronów przyspieszonych napięciami rzędu kilkunastu do kilkudziesięciu kilowoltów. Może dojść do rozprośnień:

- (i) niesprężystych, kiedy oddziałujące elektrony wiązki tracą część swojej energii kinetycznej lub z samego materiału próbki wybijane są elektrony (elektrony wtórne)
- (ii) sprężystych, gdy elektrony wiązki są odbijane od powierzchni próbki bez utraty energii (elektrony wstecznie rozproszone).

Aby zmniejszyć prawdopodobieństwo oddziaływania elektronów z cząstkami znajdującymi się w atmosferze, pomiarów dokonuje się w wysokiej próżni (ciśnienia mniejsze niż 10^{-4} Pa). Ponieważ długość fali materii związana z przyspieszonymi elektronami jest rzędu 50 pm, możliwe staje się wykonanie znacznie ostrzejszych obrazów niż przy użyciu mikroskopii optycznej oraz powiększenia do 200 000 razy.

Pomiary skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) zostały wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego Hitachi S-4700 z emisją polową (zimna katoda) pracującego przy napięciu przyspieszania elektronów wynoszącym 20 kV. Mikroskop wyposażony jest w spektrometr energii (*Energy Dispersive Spectrometer Vantage*) z detektorem chłodzonym ciekłym azotem, niezależne dwa detektory elektronów wtórnych (*Secondary Electrons Detector*), detektor elektronów wstecznie rozproszonych (*Backscattered Electrons Detector*) typu YAG oraz detektor luminescencji katodowej MiniCL GATAN.

5.2.6 Mikrotomografia komputerowa

Mikrotomografia komputerowa jest metodą wykorzystywaną do obrazowania struktury przestrzennej próbek biologicznych, *in vivo*. Polega na obserwacji stopnia osłabienia wiązki promieniowania rentgenowskiego przechodzącej przez obrazowany materiał. Podstawowe elementy układu to lampa rentgenowska, będąca źródłem promieniowania oraz detektor półprzewodnikowy rejestrujący osłabioną wiązkę fotonów po przejściu przez materiał. Trójwymiarowe odtworzenie struktury jest możliwe dzięki złożeniu wielu skanów wykonanych pod różnymi kątami. W tym celu badana próbka obraca się wokół linii lampa rentgenowska – detektor.

Napięcia hamujące elektrony w lampie rentgenowskiej zależą od rodzaju obrazowanego materiału. Dla próbek biologicznych (niskie zdolności pochłaniania promieniowania) są to niskie napięcia rzędu kilkudziesięciu kilowoltów.

Użyty w eksperymencie mikrotomograf Nanotom S pracuje z lampą rentgenowską o mocy 57 W i napięciem hamującym do 180 kV. Jest to napięcie wystarczające nie tylko do obrazowania próbek biologicznych, ale i próbek silnie pochłaniających promieniowanie

rentgenowskie (np. metali). Maksymalny rozmiar próbek, które mogą być obrazowane wynosi około 10 cm.

5.2.7 Fluorymetria

Badania aktywności fotosyntetycznej plech grzyba zlichenizowanego *Cetriaria aculeata* przeprowadzono przy użyciu zestawu Open FluorCam FC 800-O, Photon System Instruments, którego głównymi elementami są: cztery diody LED oświetlające pole badawcze fotosyntetycznie czynnym światłem czerwonym oraz kamera rejestrująca sygnał fluorescencji próbki, który dalej przesyłany jest do komputera. Geometria układu pozwala dobrać odpowiednie kąty oświetlenia oraz odległość diod LED od próbki. Maksymalny obszar obrazu w zależności od stosowanych diod wynosi od 13 cm × 13 cm do 20 cm × 20 cm.

Dane uzyskane przy użyciu fluorymetru zostały opracowane przy użyciu programu FluorCam 7.0, Photon System Instruments, analizującego minimalny i maksymalny poziom fluorescencji oraz, w oparciu o te dane, wyznaczającego poziom aktywności fotosyntetycznej (równanie (5.8)). Użytkownik programu ma możliwość, w obrębie badanego pola, wybrania obszarów, dla których poziom ten będzie liczony oddzielnie oraz uśrednienia wyniku po całym polu badawczym.

Fotosystem II (*PS II*) stanowi jedną z najistotniejszych części aparatu fotosyntetycznego fotobiontów, bowiem odpowiedzialny jest za absorpcję energii świetlnej, wykorzystywanej do katalizy cząsteczek wody. Badania aktywności fotosyntetycznej fotosystemu II opierają się na analizie energii oddanej przez naświetloną próbkę światłem o długości fali 680 nm (maksymalna wydajność *PS II*) w postaci fluorescencji.

Energia E zaabsorbowana przez *PS II* po części wykorzystywana jest w procesie fotosyntezy (P), a po części rozpraszana w postaci fluorescencji F oraz energii cieplnej Q :

$$E = P + F + Q \quad (5.4)$$

Przez wydajność fotosyntezy Φ_{PSII} rozumie się stosunek energii wykorzystanej w tym procesie do całkowitej energii zaabsorbowanej przez fotosystem II:

$$\Phi_{PSII} = \frac{P}{E} = \frac{E - (F + Q)}{E} \quad (5.5)$$

Zakładając, że Φ_{PSII} dla danego układu jest stałą, to znaczy nie zależy od energii zaabsorbowanej przez *PS II*, energia Q oddana w procesach cieplnych jest funkcją F , a wtedy energia rozpraszona D :

$$D = F + Q = D(F) \quad (5.6)$$

jest także funkcją F , co prowadzi do:

$$\Phi_{PSII} = \frac{E - D(F)}{E} \quad (5.7)$$

Jeśli próbka zostanie oświetlona słabym światłem czynnym fotosyntetycznie, wówczas zarejestrowany poziom fluorescencji będzie miernikiem strat D . Jeśli natomiast oświetlić próbkę mocnym światłem, wówczas proces fotosyntezy zostanie wysycony i zablokowany, a energia wypromieniowana w procesie fluorescencji będzie odpowiadała energii zaabsorbowanej. Wobec powyższego aktywność fotosyntetyczną można przedstawić jako stosunek:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F_p - F_0}{F_p} \quad (5.8)$$

gdzie F_p jest maksymalną, a F_0 minimalną wartością energii wydzielanej w procesie fluorescencji przez badaną próbkę.

5.3 Numeryczne opracowanie danych

Dane pomiarowe dotyczące pomiarów NMR w domenie czasu wykonano przy użyciu programów: CracSpin, powstałego w Zakładzie Radiospektroskopii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz komercyjnie dostępnego oprogramowania Origin 7.0. Kinytyki dehydratacji, hydratacji, izotermy sorpcyjne, dane uzyskane w pomiarach MRJ w domenie częstotliwości a także fluorymetrii wykonano przy użyciu programu Origin 7.0.

5.3.1 Program CracSpin

Program CracSpin, powstał jako narzędzie do analizowania sygnałów MRJ, między innymi do analizy zaniku swobodnej precesji. Wykorzystuje algorytm Marquarta. Jednowymiarowa procedura programu CracSpin umożliwia dopasowanie złożenia funkcji Gaussa (maksymalnie dwie składowe) i funkcji eksponencjalnej (maksymalnie siedem składowych), jak również funkcji *stretched exponential* dla wykładnika fraktalnego $\alpha < 1$. Przy jego pomocy można wyznaczyć amplitudy poszczególnych składowych oraz czasy

charakteryzujące ich zanik (czasy relaksacji T_2^*). Program pozwala na ustalenie określonych parametrów i dopasowanie tylko części z nich.

Program CracSpin może dokonać dwuwymiarowej analizy danych poprzez analizę jednowymiarowego przekroju poprzecznego macierzy relaksacji [Węglarz, Harańczyk, 2000]. Program CracSpin działa w oparciu o minimalizację funkcji (algorytm Marquardta)

$$S(\vec{a}) = \sum_{k=1}^N \frac{[R(t_k, \vec{a}) - M_k]^2}{\sigma_k^2}, \quad (5.9)$$

gdzie M_k jest mierzona w eksperymencie wartością, σ_k^2 jest jej wariancją, $\vec{a}$ wektorem reprezentującym dopasowywane parametry, a $R(t_k, \vec{a})$ jest postulowaną funkcją opisującą relaksację. Wynikiem algorytmu jest otrzymanie wektora parametrów minimalizującego zależność (5.9)

Program przedstawia także informację o funkcji rezydualnej:

$$r_k = R(t_k, \vec{a}_{\min}) - M_k. \quad (5.10)$$

Pozwala to na ocenienie jakości dopasowania. Jeśli r_k oscyluje wokół wartości 0, wówczas wektor parametrów $\vec{a}_{\min}$ można uznać za dobrze dopasowany. Systematyczne odchylenie r_k od wartości 0 sugeruje istnienie lepszego modelu opisującego funkcję FID.

5.3.2 Program Origin 7.0

Program Origin ver. 7.0, OriginLab Corporation, Northampton Massachusetts, USA pracuje w oparciu o podstawę algorytmu Levenberga-Marquardta, poszukuje lokalnie najmniejsze wartości funkcjonału:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^N [f(t_k, \vec{a}) - y_k]^2. \quad (5.11)$$

Program Origin 7.0 ma możliwość dopasowania do danych doświadczalnych dowolnie zdefiniowanej przez użytkownika funkcji. Ma także możliwość wyboru określonego obszaru danych, a także ustalenia wartości części parametrów.

Program posiada możliwość dopasowywania do danych pomiarowych dowolnej funkcji zdefiniowanej przez użytkownika. Może też pracować na dowolnym obszarze danych. Przy użyciu programu Origin 7.0 możliwe jest zatem dopasowanie zarówno funkcji Gaussa jak i

Abragama, a także funkcji eksponencjalnych. Tak, jak przy użyciu programu CracSpin, można ustalić wartości wybranych parametrów.

IV. WYNIKI

6. Obrazowanie plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

Do obrazowania żywych plech *Cetraria aculeata* wybrano dwie różne techniki: mikroskopii elektronowej pozwalającą zobaczyć strukturę plechy i szczegóły anatomiczne jej budowy, a także mikrotomografię komputerową umożliwiającą rozdzielenie komórek fotobionta i mykobionta.

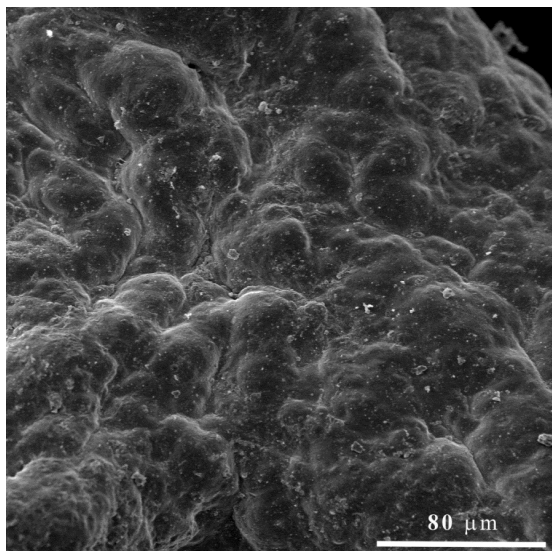
6.1 Mikroskopia skaningowa plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

6.1.1 Powierzchnia plechy

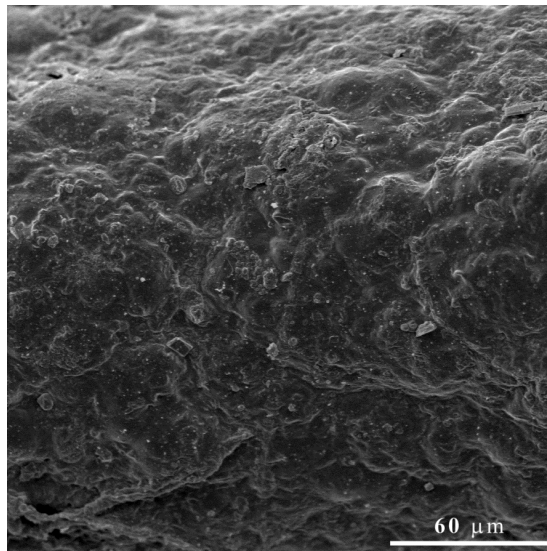
Obrazy powietrznie suchej plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zostały wykonane w zakresie powiększeń 200 – 3500 razy. Obrazy powierzchni plechy ukazały pofałdowanie w każdej z obserwowanych skal. Rysunek 6.1 przedstawia powierzchnię plechy w różnych powiększeniach.

Na powierzchni plech zaobserwowano liczne wyłobienia, wypustki i narośla. Na zdjęciach wykonanych w największym powiększeniu (rys. 6.1d, powiększenie 3500×) można dostrzec niewielkie zagłębienia o średnicy około mikrometra, które mogą być porami, przez które molekuły wody penetrują do wewnętrznych części grzyba zlichenizowanego.

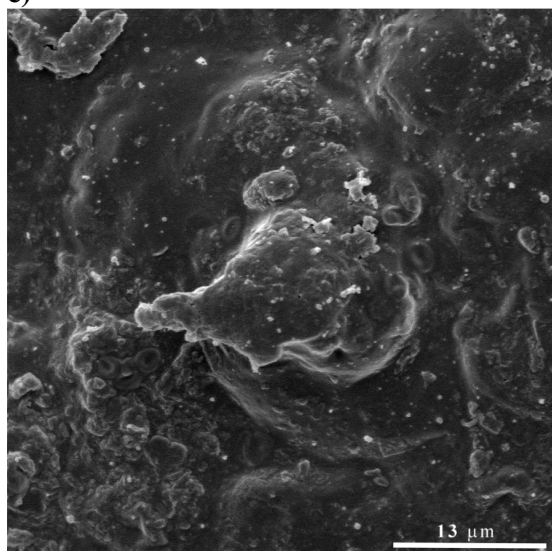
a)



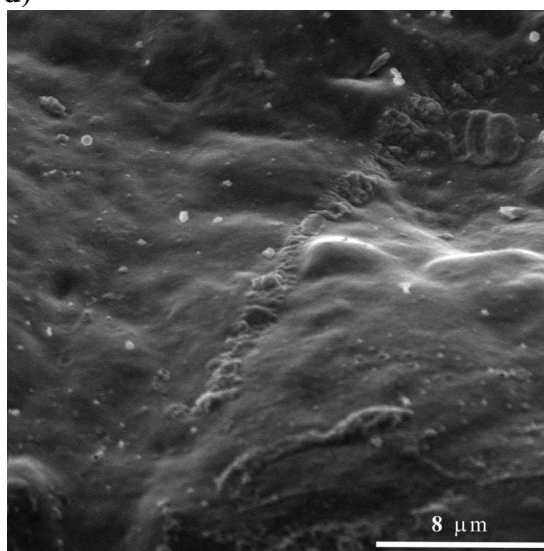
b)



c)



d)



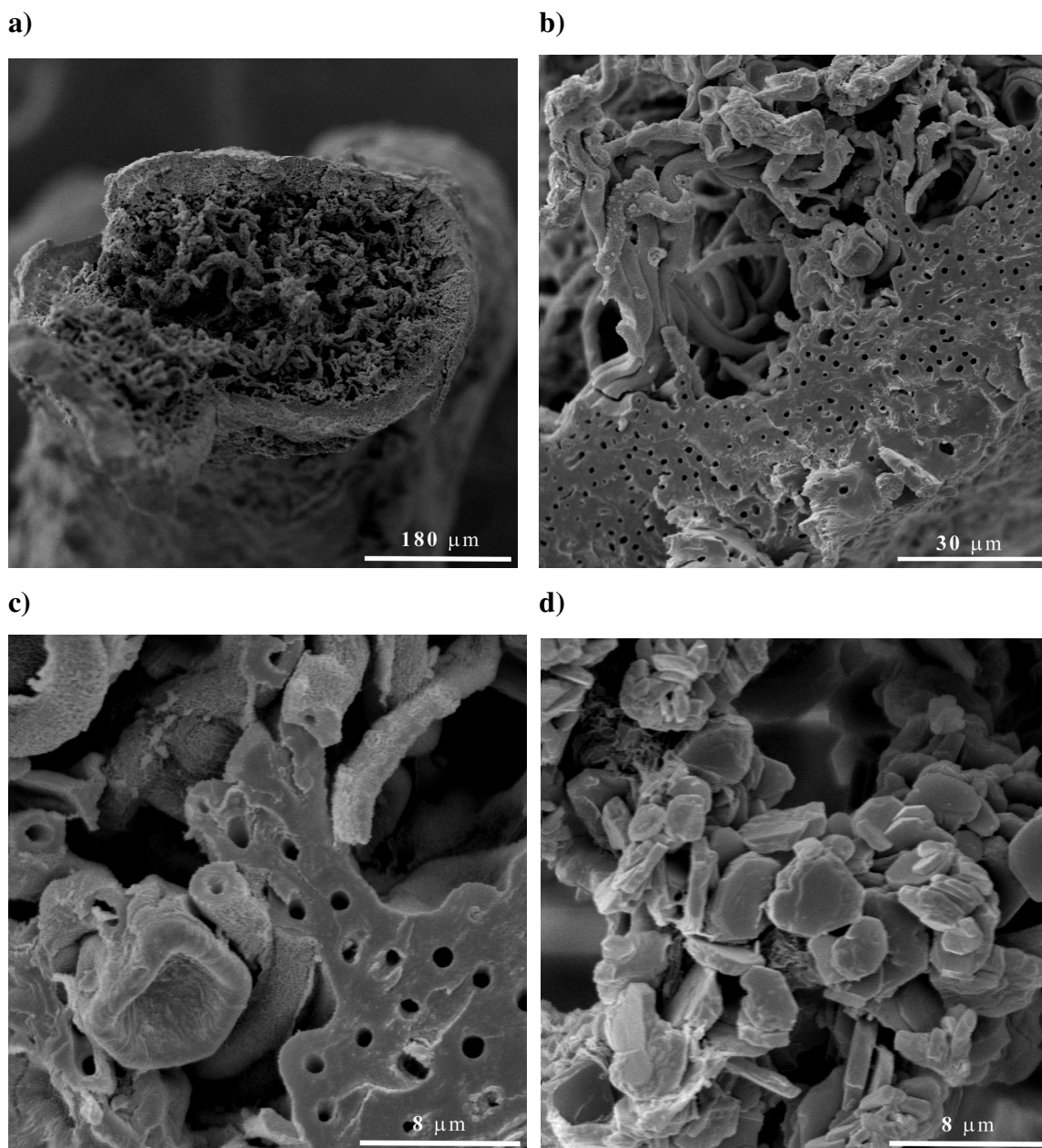
Rys. 6.1. Powierzchnia plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* w powiększeniu **a)** 350×, **b)** 500×, **c)** 2000×, **d)** 3500×.

6.1.2 Wnętrze plechy

Wykonano obrazowanie przekrojów poprzecznych trzech typów miejsc plechy: odcinków dolnych, odcinków górnych (końcowych) plechy oraz jej odgałęzień.

6.1.2.1 Odcinki dolne plechy

Obrazy przekroju odcinków dolnych pozwoliły stwierdzić, że ich kształt jest eliptyczny o długości osi wielkiej około 0.45 mm, a osi małej 0.36 mm. Jednakże jest prawdopodobne, że zniekształcenie przekroju mogło powstać w skutek krojenia preparatu. Warstwa zewnętrzna, zbudowana z ciasno ułożonych komórek mykobionta, ma grubość około 30 μm co stanowi około 15% grubości całej plechy. Wewnętrzna struktura warstwy korowej ujawnia liczne kanaliki znajdujące się wewnątrz komórek grzybni. Komórki te ułożone są równolegle do osi plechy. Średnica kanalików jest mniejsza niż 1 μm . W wewnętrznej części plechy (warstwa gonidialna) strzępki grzybni ułożone są luźno, w sposób przypadkowy bez wyróżniania żadnego kierunku. Średnica pojedynczych strzępków wynosi około 3 μm . Między strzępkami grzybni znajdują się pojedyncze komórki komponentu glonowego. Ich rozmiar wynosi około 8 μm . W stanie powietrznie suchym komórki są wklęsłe, co świadczy o ich dużym odwodnieniu. Na powierzchni niektórych strzępków grzybni, szczególnie w głębszej warstwie plechy (warstwa środkowa) zaobserwować można niewielkie, prostopadłościenne kryształki o szerokości mniejszej niż 1 μm i długości kilku mikrometrów. Prawdopodobnie są to kryształy szczawianu wapnia lub innych metabolitów wtórnych [Perez-Ortega i in., 2012].



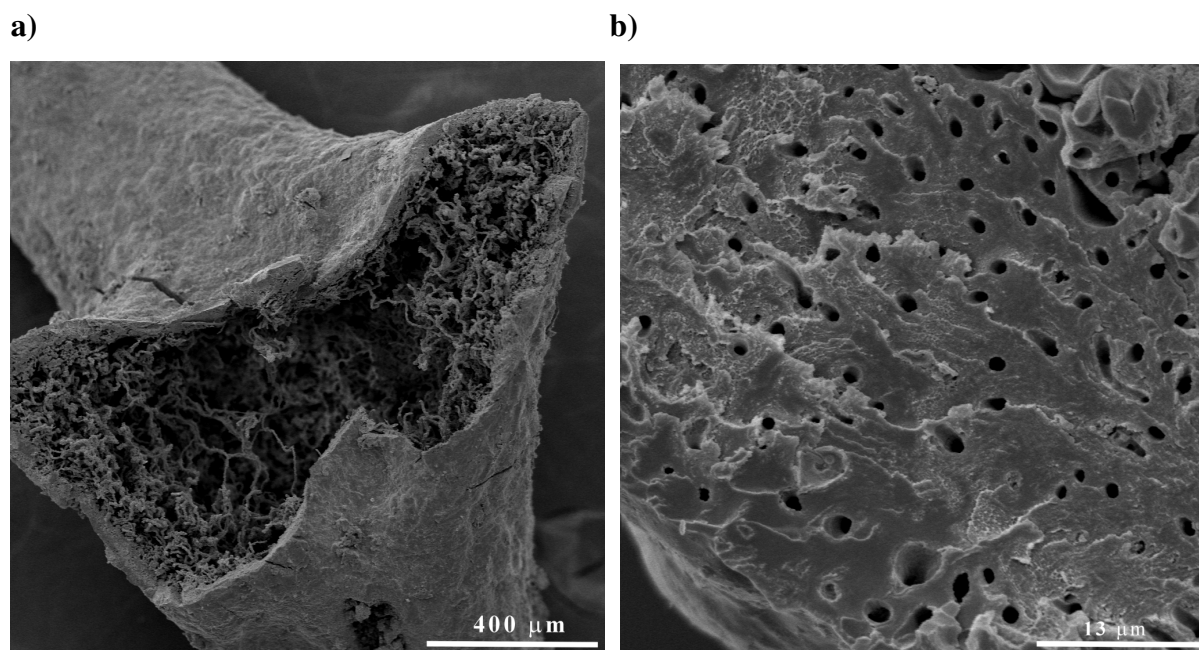
Rys. 6.2. Obrazy wnętrza odcinka dolnego plechy *Cetraria aculeata* w powiększeniu **a)** 150×, **b)** 1000×, **c)** 3500×, **d)** 3500×.

6.1.2.2 Odgałęzienia plechy

Najniżej położone rozgałęzienia plechy to miejsca o największym polu przekroju poprzecznego. Na Rysunku 6.3 przedstawiono obrazy odgałęzienia plechy między odcinkiem

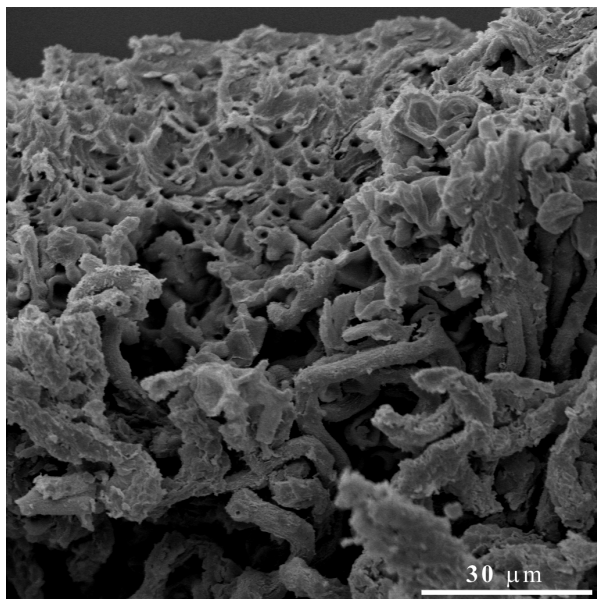
dolnym a odcinkiem górnym plechy. Rozmiar przekroju plechy wynosi około 0.5 mm x 1 mm. Warstwa korowa i gonidialna mają zbliżoną grubość do tej występujących w odcinkach dolnych, natomiast warstwa środkowa jest znacznie większa (jej grubość stanowi około 80% grubości plechy). Występują też znacznie większe obszary puste (pustacie) niż w wypadku odcinków dolnych plechy. Struktura warstwy korowej jest podobna do tej, występującej w odcinku dolnym, chociaż granice między poszczególnymi strzępkami tworzącymi zbitą strukturę są mniej zauważalne, co świadczy o tym, że strzępki grzybni są ciaśniej upakowane. W warstwie podkorowej występują luźniej ułożone strzępki grzybni, między którymi zlokalizowane są komórki glonu. Warstwa gonidialna odgałęzienia plechy i odcinka dolnego plechy nie jest rozróżnialna.

W warstwie środkowej, podobnie jak w odcinkach dolnych plechy, wyraźnie widoczne są strzępki grzybni pokryte kryształkami będącymi produktami metabolizmu komórek. Wydaje się, że kryształków jest więcej niż na strzępkach budujących odcinki dolne.

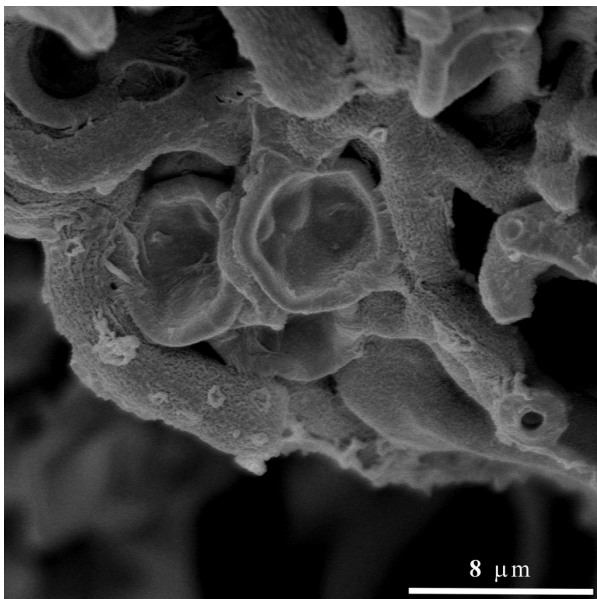


Rys. 6.3 a), b). Obrazy rozgałęziania plechy *Cetraria aculeata* w powiększeniu a) 75×, b) 2000×.

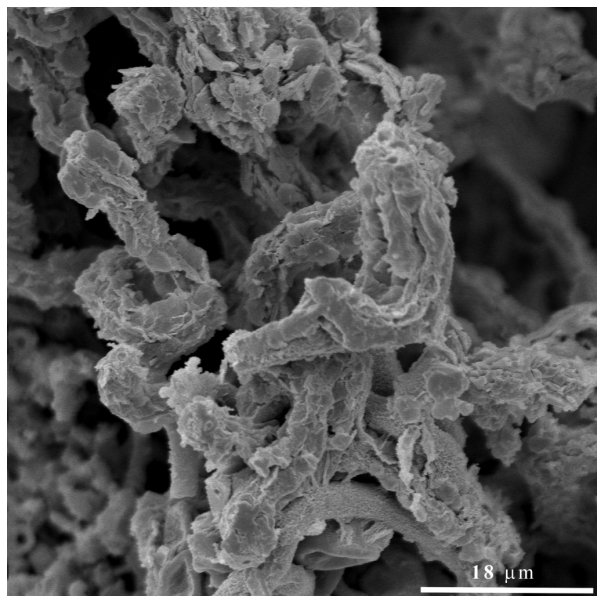
c)



d)



e)

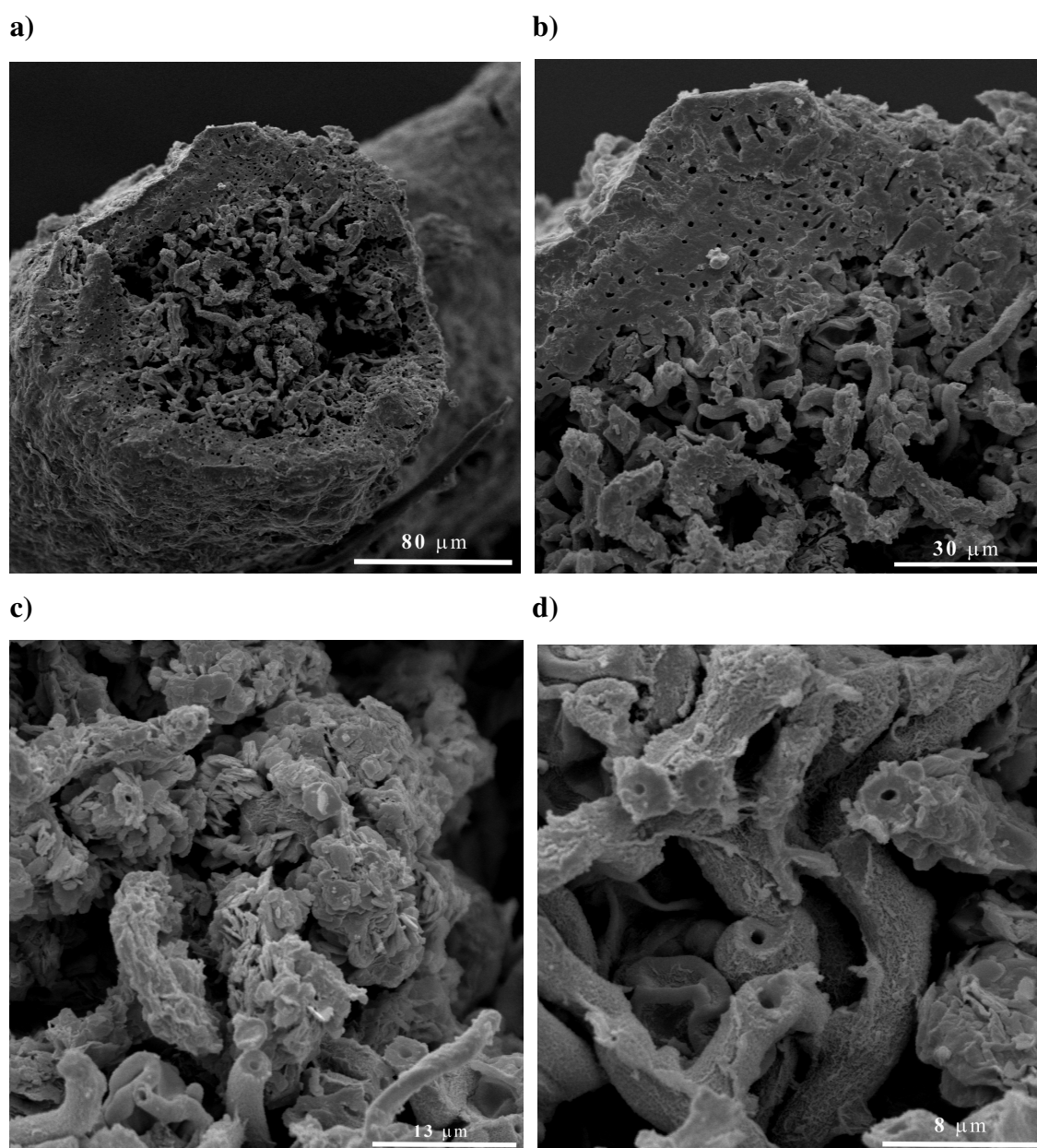


Rys. 6.3 c) - e). Obrazy rozgałęziania plechy *Cetraria aculeata* w powiększeniu **c)** 1000×, **d)** 3500×, **e)** 1500×

6.1.2.2 Odcinki końcowe

Przekroje poprzeczne odcinków końcowych są koliste o średnicy mniejszej od 200 μm (zależnie od miejsca wykonania przekroju). Ich warstwa korowa ma podobną grubość jak w pozostałych częściach plechy jednak stanowi największy procent grubości całej plechy (powyżej 30% zależnie od miejsca wykonywania przekroju). Strzępki grzybni ułożone są

podobnie jak w odcinkach dolnych, równoległe do osi plechy i w taki sposób, że da się wyodrębnić poszczególne strzępki budujące zwartą strukturę. W warstwie podkorowej znajduje się znacznie mniej komórek glonu w porównaniu do pozostałych części plechy. Obecne są luźno ułożone strzępki grzybni wyraźnie pokryte przez kryształki szczawianu wapnia. Strzępki mają takie same rozmiary jak w innych częściach plechy.



Rys. 6.4. Obrazy odcinków górnych plechy *Cetraria aculeata* w powiększeniu: **a)** 350X, **b)** 1000X, **c)** 2000X, **d)** 3500X.

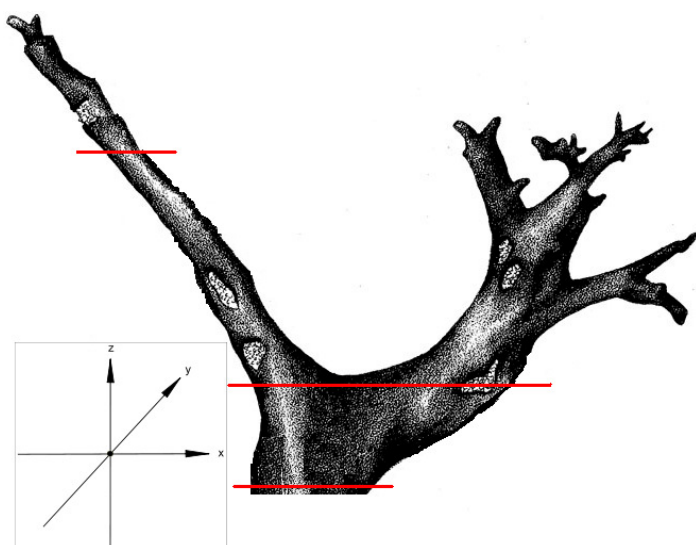
Obrazy uzyskane dzięki mikroskopii elektronowej pozwoliły rozróżnić struktury poszczególnych trzech typów miejsc w plesze. Na ich podstawie można stwierdzić, że warstwa korowa ma jednakową grubość niezależnie od miejsca, jednak strzępki grzyba

najmocniej upakowane są w odgałęzieniach plechy, gdzie warstwa korowa jest jednolita (nie da się wyróżnić poszczególnych strzępeków grzybni), jedynie widoczne są kanaliki będące częścią struktury wewnętrznej strzępeków.

Komórki fotobiontyczne zlokalizowane są głównie w odcinkach dolnych i odgałęzieniach plechy, natomiast są prawie nieobecne w szczytowych częściach plech. Nieregularny, wklęsły kształt komórek glonu, niezależnie od położenia w plesze, wskazuje na duży stopień odwodnienia.

6.2 Mikrotomografia rentgenowska plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

Pomiary mikrotomograficzne grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wykonano w płaszczyźnie xy wzdłuż osi plechy. Rysunek 6.5 przedstawia schemat plechy wraz układem osi tomograficznych oraz miejscami, z których w dalszej części rozdziału przedstawiono przekroje poprzeczne.



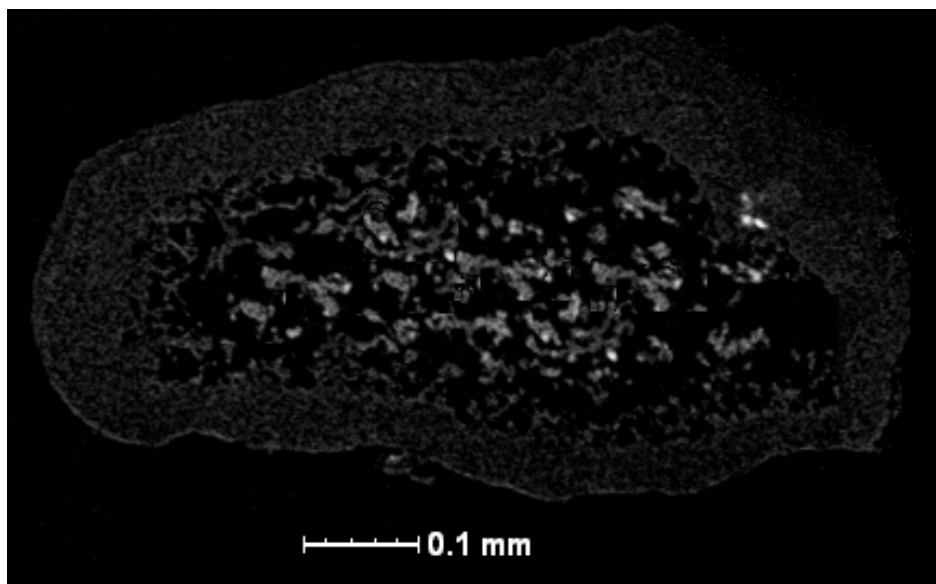
Rys. 6.5. Szkic plechy *Cetraria aculeata* wraz z zaznaczonymi miejscami (czerwona linia), z których w dalszej części rozdziału pokazano mikrotomogramy oraz układem osi mikrotomograficznych.

Odcień fragmentów mikrotomogramów przedstawionych na Rysunkach 6.6 – 6.8 związany jest ze stopniem pochłaniania promieniowania rentgenowskiego. Odcienie ciemne oznaczają małe pochłanianie, odcienie jasne – większe.

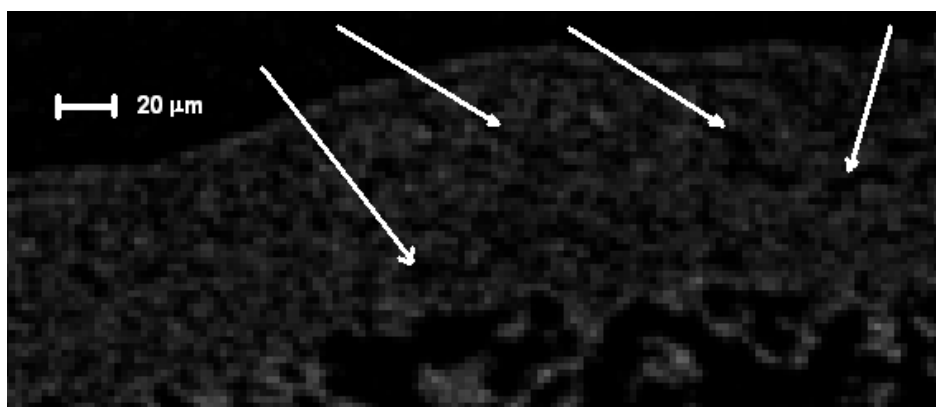
Przekrój poprzeczny odcinka dolnego plechy (poniżej odgałęzienia) został przedstawiony na Rysunku 6.6a. Pomiary mikrotomograficzne potwierdziły obserwacje

dokonane w pomiarach z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej, że odcinki dolne mają przekrój eliptyczny o rozmiarach osi wielkich około 0.4 mm i 0.3 mm. Stwierdzono, że komórki fotobiontu, znajdującego się wewnątrz plechy lepiej pochłaniają promieniowanie rentgenowskie - są jaśniejsze - niż komórki mykobionta. Liczba komórek komponentu glonowego stanowi około 10% liczby komórek mykobionta. Pustacie wewnątrz plechy stanowią około 1/3 pola powierzchni całego przekroju plechy. Rysunek 6.6b przedstawia powiększenie warstwy korowej. Można na nim dostrzec liczne puste przestrzenie w postaci kanalików o rozmiarach kilku mikrometrów (obszary o bardzo niskim pochłanianiu promieniowania rentgenowskiego), co świadczy o tym, że warstwa korowa badanej plechy ma charakter porowaty.

a)

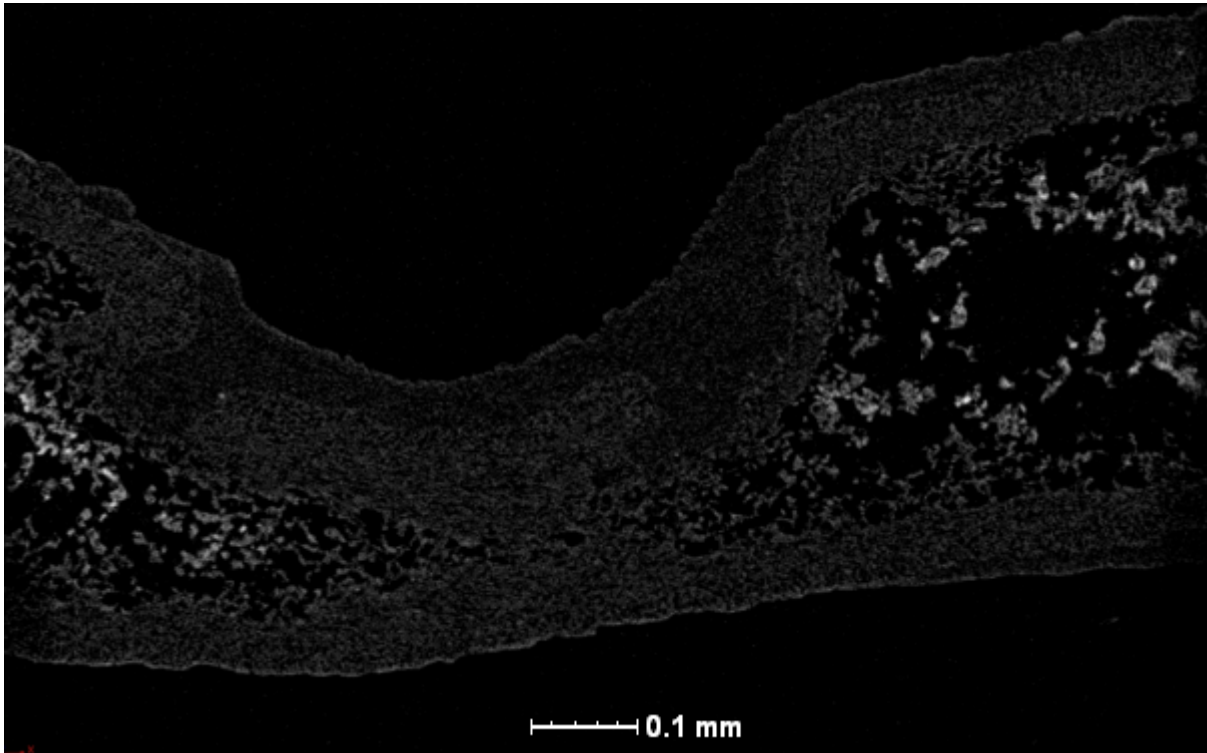


b)



Rys. 6.6 Obraz mikrotomograficzny przekroju plechy *Cetraria aculeata* pochodzącego z jej odcinka dolnego: **a)** przekrój w całości, **b)** powiększenie warstwy korowej, w której zaznaczono puste kanaliki.

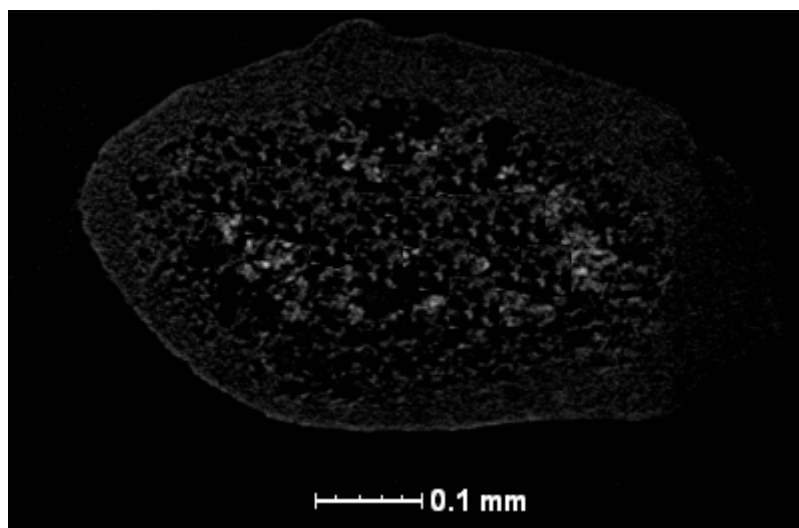
Obraz mikrotomograficzny przekroju odgałęzień plechy pokazuje, że jest to obszar, w którym, w zależności od miejsca, dominują pustacie (dolna część odgałęzień) lub warstwa korowa (górna część odgałęzień). Na Rysunku 6.7 pokazano górną część odgałęzienia, w której dochodzi już do wyraźnego rozdziału na dwa odcinki górne, więc w jego centralnej części dominuje warstwa korowa.



Rys. 6.7. Mikrotomograficzny obraz przekroju poprzecznego odgałęzienia plechy *Cetraria aculeata*.

Komórki fotobiontu w tej części plechy są mniej liczne niż w jej dolnych odcinkach i położone blisko warstwy korowej.

W warstwie wewnętrznej części górnej plech dominują komórki mykobionta. Rysunek 6.8 przedstawia przekrój poprzeczny plechy blisko jej szczytowej części. Warstwa rdzeniowa w dużej części składa się z luźno ułożonych komórek grzybni. Komórki fotobionta są obecne w znacznie mniejszej liczbie niż w przypadku odcinków dolnych plech i ułożone są blisko warstwy korowej.



Rys. 6.8. Obraz mikrotomograficzny przekroju poprzecznego odcinka górnego plechy *Cetraria aculeata*.

W górnych odcinkach plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* można zatem wyróżnić trzy dobrze oddzielone od siebie warstwy: korową, gonidialną i rdzeniową. Pustacie obecne w tych częściach plechy są znacznie mniejsze niż w łodygach i zlokalizowane głównie w części podkorowej.

Pokazany na Rysunku 6.8 przekrój poprzeczny plechy jest eliptyczny. Powodem zniekształcenia jest wykonanie przekroju pod kątem ostrym do osi gałązki (Rys. 6.5).

7. Aktywność fotosyntetyczna PS II plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

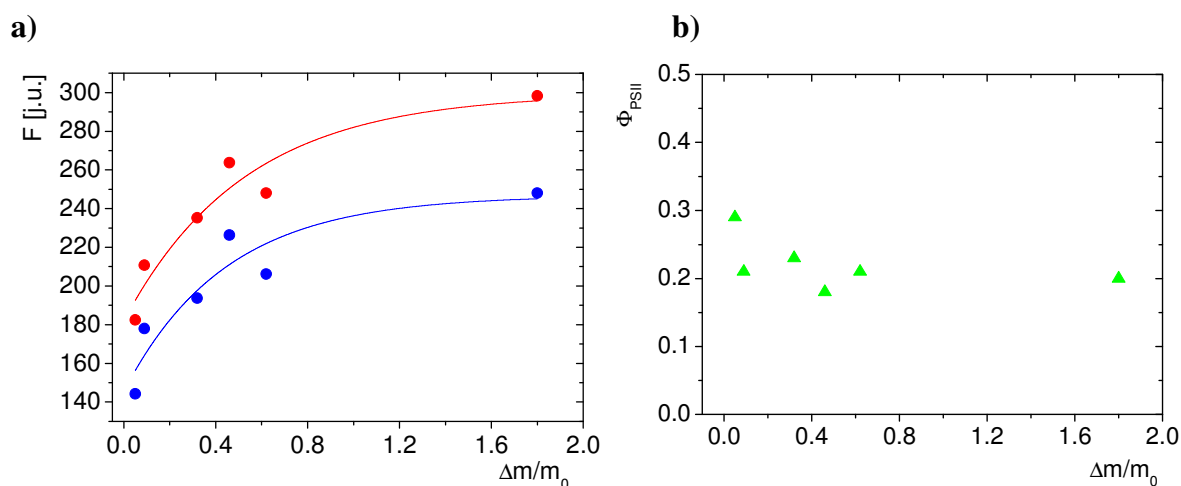
Pomiary aktywności fotosyntetycznej komórek fotobionta grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zostały wykonane dla sześciu różnych hydratacji plechy: dla próbek suchych inkubowanych nad powierzchnią żelu krzemionkowego ($\Delta m/m_0 = 0.05$), dla plech powietrznie suchych ($\Delta m/m_0 = 0.09$), dla plech uwadnianych z fazy gazowej (dla $p/p_0 = 100\%$), dla różnych czasów hydratacji ($\Delta m/m_0 = 0.32 - 0.62$) oraz dla plechy uwadnianej z fazy cieczowej ($\Delta m/m_0 = 1.8$). Przed przystąpieniem do pomiarów wszystkie próbki inkubowano w ciemności przez 15 minut. Zależności średniej energii emitowanej na sposób fluorescencji z całego pola widzenia od poziomu uwodnienia plech po podaniu słabego impulsu (niski poziom fluorescencji) oraz impulsu o natężeniu $326 \frac{\mu E}{s \cdot m^2}$ wysycającego proces fotosyntezy (wysoki poziom fluorescencji) przedstawia Rysunek 7.1a. Do zebranych danych dopasowano fenomenologiczną zależność eksponencjalną – dla energii emitowanej na sposób fluorescencji, F_p , po podaniu silnego impulsu światła:

$$F_p = (181 \pm 15) + (117 \pm 21) \cdot [1 - \exp[-\Delta m / m_0 / (0.53 \pm 0.23)]] , \quad (7.1)$$

a dla energii, F_0 , emitowanej po podaniu słabego impulsu:

$$F_0 = (145 \pm 18) + (101 \pm 23) \cdot [1 - \exp[-\Delta m / m_0 / (0.44 \pm 0.24)]] . \quad (7.2)$$

Wraz z rosnącym uwodnieniem następuje wzrost fluorescencji minimalnej F_0 oraz fluorescencji maksymalnej F_p badanych plech. Fluorescencja maksymalna rośnie od poziomu (181 ± 15) j.u. dla plech całkowicie suchych ($\Delta m/m_0 = 0$) i dąży do poziomu (298 ± 36) j.u. dla plech o dużym uwodnieniu. Fluorescencja minimalna wzrasta od (145 ± 18) j.u. (dla plech całkowicie suchych) do poziomu nasycenia (246 ± 41) j.u.

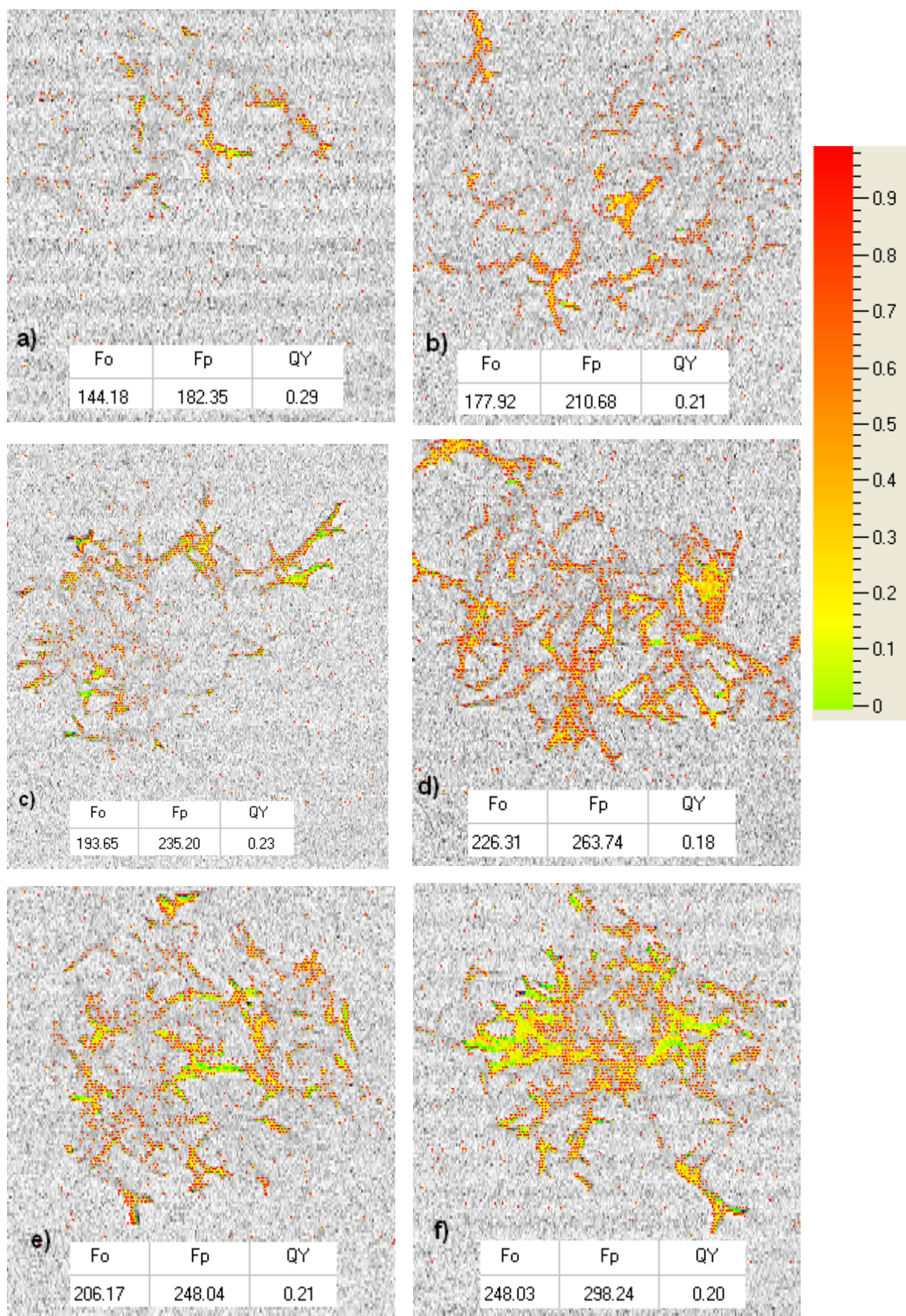


Rys. 7.1. a) Średnia aktywność fotosyntetyczna fotobiontu *Cetraria aculeata* zarejestrowana po podaniu słabego impulsu światła (●) oraz impulsu wysycającego proces fotosyntezy (●) w zależności od ich poziomu uwodnienia, **b)** Średnia aktywność fotosyntetyczna *PS II* w zależności od poziomu uwodnienia plech.

Aktywność fotosyntezy systemu *PS II* (Rys. 7.1b) nie zmienia się w sposób znaczący – waha się od 0.29 dla plech najsuchszych, do 0.18 dla plech o poziomie uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.46$. Poziomy te są porównywalne z poziomami aktywności fotosyntetycznej dla innych grzybów zlichenizowanych, jednak znacznie niższe niż dla roślin wyższych, gdzie średnia aktywność fotosyntetyczna wynosi 0.8.

Przestrzenny rozkład aktywności poszczególnych obszarów plech przedstawiony został na Rysunku 7.2. Wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia fluorescencja indukowana jest dla całych morfologicznie wyodrębnionych fragmentów plechy, a nie przypadkowo dla pojedynczych komórek fotobionta rozsianych w plesze.

Plechki uwadniane z fazy cieczowej charakteryzują się dużym obszarem występowania fotosyntezy, jednak jej aktywność jest taka, jak w przypadku pozostałych próbek.



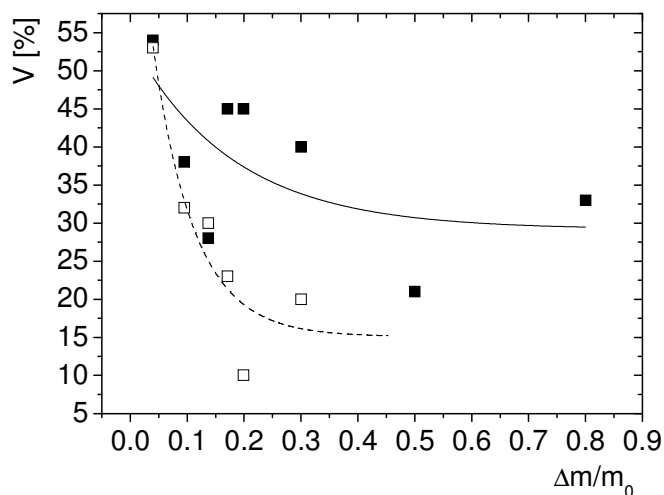
Rys. 7.2. Zmiany aktywności fotosyntetycznej fotobiontu grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wraz z rosnącym poziomem uwodnienia: **a)** $\Delta m/m_0 = 0.05$, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.09$, **c)** $\Delta m/m_0 = 0.32$, **d)** $\Delta m/m_0 = 0.46$, **e)** $\Delta m/m_0 = 0.62$, **f)** $\Delta m/m_0 = 1.8$. Fo – średnia fluorescencja po słabym impulsie światła, Fp – średnia fluorescencja po mocnym impulsie światła, QY – średnia wydajność fotosyntetyczna badanych plech. Kolory na rysunku według skali zamieszczonej po lewej stronie odnoszą się do średniej aktywności fotosyntetycznej komórek fotobionta.

Stosunkowo niska aktywność fotosyntetyczna grzybów zlichenizowanych w porównaniu do roślin wyższych może być spowodowana tym, że komórki fotobionta grzybów zlichenizowanych zlokalizowane są pod warstwą korową i dodatkowo otoczone komórkami strzępek grzybni, zatem dostęp promieniowania elektromagnetycznego do nich jest utrudniony. Ograniczenie maksymalnego poziomu fotosyntezy ma też na celu uniknięcie uszkodzeń komórek fotobionta powstających na skutek oddziaływania silnego światła.

8. Oznaczenie żywotności komórek fotobiontu grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

Żywotność komórek fotobiontycznych grzyba zlicheniozwanego *Cetraria aculeata* (rozumiana jako stosunek liczby komórek żywych do liczby wszystkich komórek fotobionta) została wyznaczona dla plech zebranych w 2009 r. oraz dla plech zebranych w 1987 r. Przygotowano dwie serie próbek – pierwszą, w której uwodnione plechy stale utrzymywano w temperaturze pokojowej oraz drugą, w której plechy po uwodnieniu do określonych poziomów, zostały schłodzone do temperatury -60°C i przechowywane w niej 10 minut, a następnie przed pomiarem ogrzane do temperatury pokojowej. Szybkość chłodzenia/ogrzewania wynosiła $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Rys. 8.1 przedstawia zależność żywotności komórek fotobionta *Cetraria aculeata* od uwodnienia dla plech zebranych w 2009 r.



Rys. 8.1. Żywotność komórek komponentu fotobiontycznego grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* w zależności od ich uwodnienia (■ - próbka kontrolna, □, plecha schłodzona do temperatury -60°C przed pomiarem).

Do danych zebranych na Rys. 8.1. dopasowano fenomenologiczny zanik eksponencjalny.

Dla plech kontrolnych, przeżywalność komórek fotobionta, V_{niemroz} , można opisać zależnością:

$$V_{\text{niemroz}} [\%] = (29.2 \pm 9.2) + (24.9 \pm 14.6) \cdot \exp[-\Delta m / m_0 / (0.18 \pm 0.24)] \quad (8.1)$$

natomiast dla plech ochładzanych do temperatury -60°C przed oznaczeniem:

$$V_{\text{mroz}} [\%] = (15.1 \pm 7.4) + (67 \pm 21) \cdot \exp[-\Delta m / m_0 / (0.072 \pm 0.043)] \quad (8.2)$$

Wraz z rosnącym uwodnieniem plech *Cetraria aculeata* obserwuje się spadek przeżywalności komórek fotobionta. Dla próby kontrolnej jest on powolny, udział komórek żywych spada do poziomu $(29.2 \pm 9.2)\%$, przy czym przeżywalność plech całkowicie suchych ($\Delta m / m_0 = 0$) powinna wynosić 55.1%. Plechy powietrznie suche cechuje udział żywych komórek $V_{\text{niemroz}} \approx 45\%$.

Przeżywalność komórek fotobionta plech ochładzanych do temperatury -60°C spada do poziomu 15.5% dla plech uwodnionych do $\Delta m / m_0 < 0.5$. Powyżej uwodnienia $\Delta m / m_0 = 0.5$ [tj. dla wartości uwodnień, dla której w pomiarach $^1\text{H-MRJ}$ i kalorymetrycznych zaobserwowano zamarzanie wody (Rozdział 10 oraz Rozdział 11)] odnotowano pojedyncze żywe komórki.

Żywotność komórek plech fotobionta *Cetraria aculeata* zebranych w 1987 r. nie zależała od poziomu hydratacji plechy i wynosiła około 14% dla uwodnianych plech, natomiast około 10% dla plech schłodzonych do temperatury -60°C przed oznaczeniem, ogrzanych do temperatury pokojowej, a następnie uwodnionych do poziomu $\Delta m / m_0 < 0.5$. Dla uwodnień powyżej tego poziomu żywych komórek nie obserwowano.

9. Hydratacja plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

Wykonano pomiary kinetyki dehydratacji, kinetyki hydratacji, budowę izotermę sorpcyjnej oraz pomiary w NMR w domenie czasu i częstości, analizując zachowanie wody reszkowej w dehydratowanej żywej plesze grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* (Rys. 9.1).

Przypuszcza się, że na wydajność mechanizmów odporności na wysuszenie i przemarzanie mogą mieć wpływ polisacharydy (np. lichenina lub izolichenina lub inne wielocukry i wieloalkohole) zawarte w plesze [Harańczyk, 2003]. Ich wydzielanie może być zależne od aktywności fotosyntetycznej, a więc od natężenia światła.

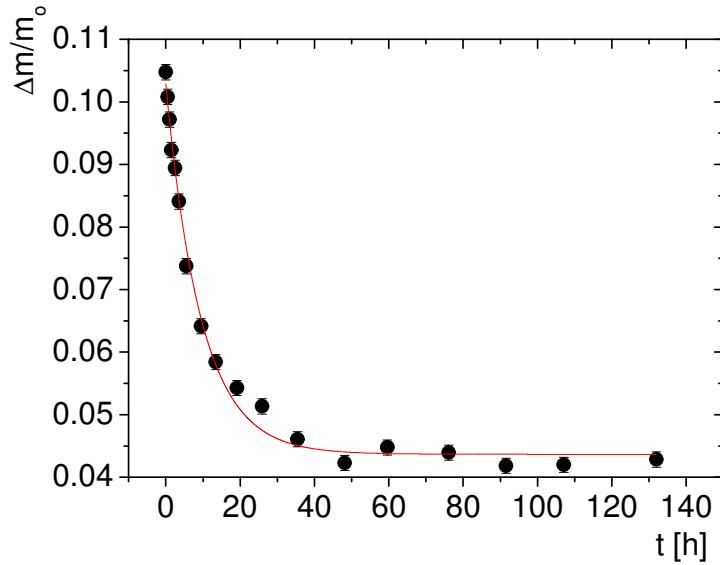
Przeprowadzono badania hydratacyjne plech grzybów zlichenizowanych z gatunku *Cetraria aculeata* zebranych w dzień pochmurny i dzień słoneczny, a następnie uśmierconych. W takim wypadku ilość wielocukrów i wieloalkoholi powinna zostać stała i nie zmieniać się w trakcie prowadzonych pomiarów.

9.1. Kinetyka dehydratacji plech *Cetraria aculeata* do fazy gazowej

Dehydratację powietrznie suchej plechy *Cetraria aculeata* nad powierzchnią żelu krzemionkowego opisuje krzywa jednoeksponencjalna:

$$\Delta m / m_0(t) = y_0 + A^d \cdot e^{-t/t^d}, \quad (9.1)$$

gdzie $\Delta m / m_0$ jest poziomem hydratacji próbki, liczoną jako masa wody Δm zawartej w plesze w jednostkach suchej masy plechy m_0 , A^d masą wody, liczonej w jednostkach suchej masy, usuniętej podczas dehydratacji, y_0 masą wody nieusuwalnej w procesie dehydratacji nad powierzchnią żelu krzemionkowego, natomiast t^d czasem dehydratacji.



Rys 9.1. Dehydratacja do fazy gazowej ($p/p_0 = h = 0\%$) żywej plechy *Cetraria aculeata*.

Wyznaczone wartości parametrów y_0 , A^d i t^d dla plech żywych wynoszą: $y_0 = 0.03056 \pm 0.0030$, $A^d = 0.0575 \pm 0.0016$, oraz $t^d = (10.17 \pm 0.66)$ h. Dla plech martwych amplituda krzywej dehydratacji wynosiła $\bar{A}^d = 0.0613 \pm 0.0098$, natomiast czas dehydratacji $\bar{t}^d = (7.88 \pm 0.97)$ h dla plech zebranych w dzień słoneczny oraz $\bar{A}^d = 0.0625 \pm 0.0051$, $\bar{t}^d = (7.5 \pm 2.7)$ h dla plech zebranych w dzień pochmurny.

9.2. Kinetyka hydratacji plech *Cetraria aculeata* z fazy gazowej

Odwodnione plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* uwadniano z fazy gazowej (Rys. 9.2 oraz Rys. 9.3).

Dla poziomów hydratacji uzyskiwanych z atmosfery o wilgotności względnej w zakresie $h = 0.09 - 0.52$ krzywe hydratacji *Cetraria aculeata* były dobrze opisane zależnością jednoeksponencjalną (9.2):

$$\Delta m / m_0(t) = A_0^h + A_1^h \cdot (1 - \exp(-t / t_1^h)), \quad (9.2)$$

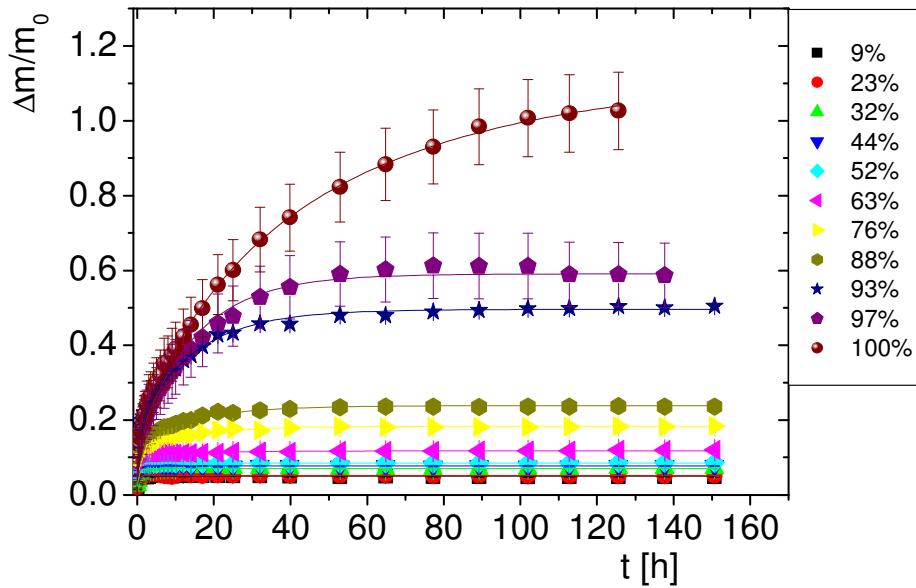
dla $h = 0.63 - 0.97$ zależność była dwueksponencjalna (9.3):

$$\Delta m / m_0(t) = A_0^h + A_1^h \cdot (1 - e^{-t/t_1^h}) + A_2^h \cdot (1 - e^{-t/t_2^h}), \quad (9.3)$$

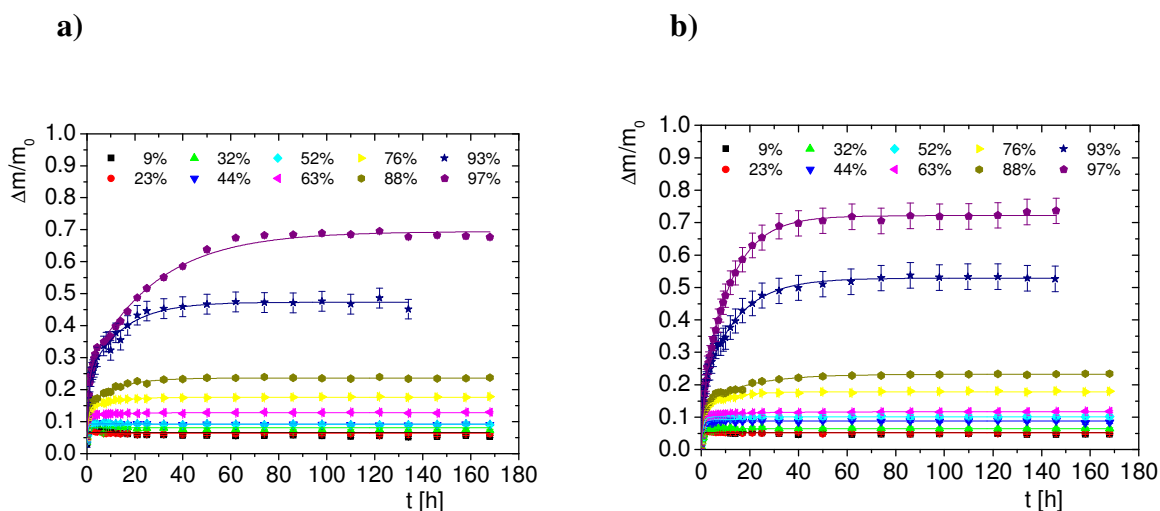
natomiast dla hydratacji $h = 1$, w plechach żywych stwierdzono obecność trzeciej składowej (9.4).

$$\Delta m / m_0(t) = A_0^h + A_1^h \cdot (1 - e^{-t/t_1^h}) + A_2^h \cdot (1 - e^{-t/t_2^h}) + A_3^h \cdot (1 - e^{-t/t_3^h}). \quad (9.4)$$

gdzie Δm to przyrost masy wywołany hydratacją, m_0 to sucha masa, wreszcie A_0^h to poziom hydratacji dla wilgotności względnej $h = 0$, A_1^h , A_2^h , A_3^h to nasyceniowe poziomy hydratacji dla pierwszej, drugiej i trzeciej składowej, odpowiednio, t_1^h , t_2^h , i t_3^h są czasami hydratacji pierwszej, drugiej i trzeciej składowej, odpowiednio. Suma amplitud $C^h = \sum_i A_i^h$ stanowi całkowity poziom uwodnienia w danej wilgotności względnej otoczenia.



Rys. 9.2. Kinetyka hydratacji żywej plechy *Cetraria aculeata* prowadzona z fazy gazowej dla różnych wilgotności względnych otoczenia. Poziomy wilgotności względnych $h = p/p_0$ zostały podane w panelu bocznym.



Rys. 9.3. Kinytyki hydratacji z fazy gazowej dla martwych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zebranych **a)** w dzień słoneczny, **b)** w dzień pochmurny.

Proces uwadniania żywych plech w atmosferze o wilgotności względnej w zakresie $h = 0.09 - 0.93$ prowadzono przez 152 h. Trasy hydratacyjne dla wilgotności największych prowadzono w czasie krótszym, ponieważ plecha zaczynała pleśnieć (dla $h = 0.93$ po około 138 h, natomiast dla $h = 1$ po około 124 h). Rozpoczął się wzrost pleśni kosmopolitycznych, zasiedlających różnorodne środowiska. Opinia mykologiczna nie potwierdziła podejrzenia, że wzrost rozpoczynają gatunki przywiezione na powierzchni plechy z Antarktydy. Wzrost pleśni utrudnił staranne wyznaczenie suchej masy dla wzmiankowanych próbek. W takim przypadku, wartość suchej masy ekstrapolowano na podstawie wartości uzyskanych dla innych próbek.

Amplituda wody najściślej związanej, nieusuwalnej podczas hydratacji w żelu krzemionkowym, uśredniona po wszystkich trasach hydratacyjnych, wynosi $\bar{A}_0^h = (0.040 \pm 0.017)$. Czas hydratacji najszybciej wiążącej się do żywej plechy *Cetraria aculeata* frakcji wody wynosi $\bar{t}_1^h = (0.43 \pm 0.10)$ h. Jest to pula wody silnie związanej do matrycy grzyba zlichenizowanego. Udział tej frakcji wody rośnie wraz ze wzrostem wilgotności atmosfery, wreszcie dla uwodnienia w $h = 0.52$ osiąga maksymalną wartość $A_1^{h=0.52} = 0.0393 \pm 0.0011$. Po nasyceniu frakcji wody silnie związanej, wraz z dalszym wzrostem wilgotności atmosfery, pojawia się kolejna frakcja wody związanej o dłuższym czasie hydratacji wynoszącym $\bar{t}_2^h = (14.2 \pm 6.2)$ h. Z powodów numerycznych procedura dopasowująca nieco miesza udział składowej $A_1^{h=0.52}$ oraz składowej A_2^h . Dla wilgotności

względnej $h = 0.97$ frakcja wody luźno związanej osiąga wartość maksymalną $A_2^{h=0.97} = 0.4425 \pm 0.0055$. Jeśli uwadnianie plechy prowadzone jest w atmosferze o wilgotności względnej $h = 1$ można wyodrębnić kolejną frakcję wody luźno związanej o czasie hydratacji, $\bar{t}_3^h = (45.5 \pm 7.7)$ h oraz o amplitudzie $A_3^h = 0.82 \pm 0.14$.

Dla martwych plech zebranych w dzień słoneczny, uśredniony czas hydratacji pierwszej składowej eksponencjalnej wyniósł $\bar{t}_1^h = (0.48 \pm 0.21)$ h, a odpowiadająca jej ilość wody wysycającej $A_1^{h=0.52} = 0.127 \pm 0.050$. Kolejna frakcja wody charakteryzuje się czasem $\bar{t}_2^h = (19 \pm 10)$ h. Plechy zebrane w dzień pochmurny scharakteryzowane są przez stałą: $\bar{t}_1^h = (0.67 \pm 0.22)$ oraz ilość wody wysycającej pierwszą składową $A_1^{h=0.52} = 0.111 \pm 0.020$. Wraz z dalszym wzrostem wilgotności atmosfery, pojawia się kolejna frakcja wody scharakteryzowana czasem hydratacji $\bar{t}_2^h = (17.0 \pm 8.5)$ h. Zarówno w przypadku plech zebranych w dzień słoneczny jak i pochmurny w kinetykach hydratacji próbek uwadnianych w atmosferach $h = 0.93$ i $h = 0.97$ wyraźnie wydłużył się czas hydratacji $\bar{t}_2^h$, co sugeruje, istnienie trzeciej składowej, jednak nie udało się jej wyodrębnić.

Plecha grzybów zlicenizowanych *Cetraria aculeata* wyróżnia się krótkimi wartościami czasów hydratacji w porównaniu do plech innych, badanych grzybów zlichenizowanych. Oznacza to, relatywnie mocniejsze wiązanie odpowiednich frakcji wody związanej niż w innych grzybach zlichenizowanych. W Tabeli 9.1 podano dla porównania wartości średnich stałych $\bar{A}_0^h$ oraz stałych czasowych dla innych grzybów zlichenizowanych.

Grzyb zlichenizowany	$\bar{A}_0^h$	t_1^h [h]	t_2^h [h]
<i>Umbilicaria aprina</i>	0.054 ± 0.011	4.7 ± 2.6	31.0 ± 1.9
<i>Umbilicaria decussata</i>	0.112 ± 0.009	-	27.3 ± 4.3
<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz ¹	0.040 ± 0.011	3.5 ± 1.0	69 ± 21
<i>Umbilicaria antarctica</i>	0.101 ± 0.018	-	55.9 ± 4.8
<i>Ramalina terebrata</i>	0.007 ± 0.001	1.24 ± 0.24	14.4 ± 2.1

Tabela 9.1. Porównanie poziomów uwodnienia plechy powietrznie suchej, $\bar{A}_0^h$, oraz czasów hydratacji dla różnych gatunków grzybów zlichenizowanych. Dane pochodzą z : [Harańczyk i in., 2008], [Harańczyk i in., 2006b], [Harańczyk, 2003], [Harańczyk i in., 2012c].

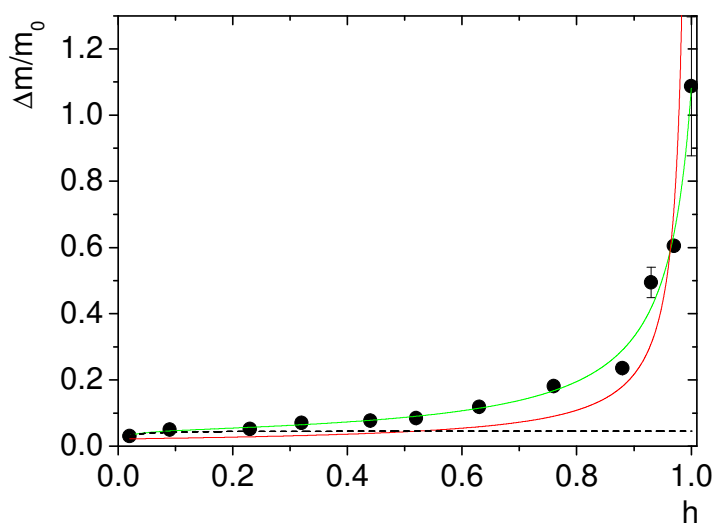
9.3. Izoterma sorpcyjna

Do skonstruowania izotermy sorpcyjnej wykorzystano zależności całkowitego poziomu hydratacji $C^h = \sum_i A_i^h$ w zależności od poziomu wilgotności względnej, dla której prowadzone były zależności kinetyki hydratacji (Tabela 9.2).

wilgotność względna, h	$C^h = \sum_i A_i^h$	wilgotność względna, h	$C^h = \sum_i A_i^h$
0.02	0.0306 ± 0.0018	0.63	0.1187 ± 0.0018
0.09	0.0501 ± 0.0029	0.76	0.1812 ± 0.0053
0.23	0.0521 ± 0.0033	0.88	0.2354 ± 0.0035
0.32	0.0705 ± 0.0028	0.93	0.4950 ± 0.0093
0.44	0.0770 ± 0.0017	0.97	0.605 ± 0.012
0.52	0.0846 ± 0.0015	1	1.09 ± 0.21

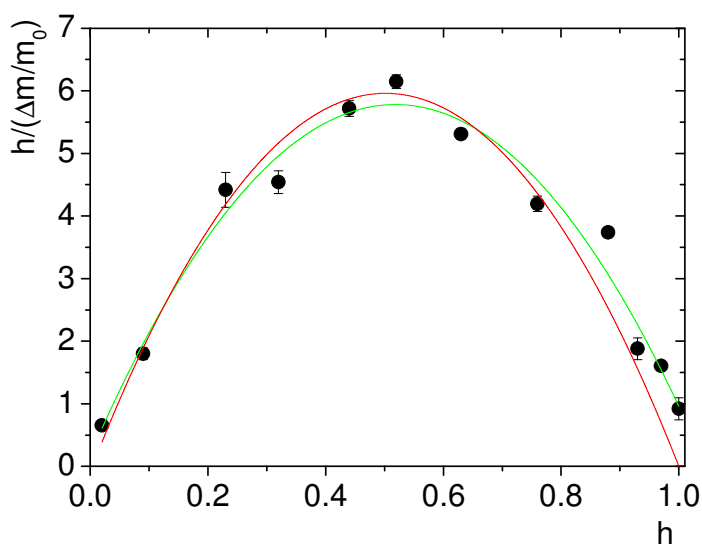
Tabela 9.2. Równowagowy poziom hydratacji plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* w funkcji wilgotności względnej atmosfery.

Rysunek 9.4 przedstawia izotermę sorpcyjną dla żywych plech *Cetraria aculeata* zbudowaną z uzyskanych danych. Zależność ma formę funkcji sigmoidalnej. Można do niej dopasować krzywe wynikające zarówno z modelu BET jak i modelu Denta, przy czym model Denta znacznie lepiej opisuje dane eksperymentalne.



Rys. 9.4. Izoterma sorpcyjna dla plechy *Cetraria aculeata*. Do danych doświadczalnych dopasowano model Denta (zielona linia ciągła), oraz model BET (czerwona linia ciągła) a stopień wysycenia pierwotnych miejsc wiążących, czyli jednomolekularnej warstwy wody (czarna linia przerywana). Parametry dopasowania przedstawiono w Tabeli 9.2.

Przedstawienie izotermy sorpcyjnej w postaci parabolicznej (4.20) pozwala jakościowo ocenić stosowność poszczególnych modeli teoretycznych do uzyskanych danych (Rys. 9.5).



Rys. 9.5. Izoterma sorpcyjna w formie parabolicznej dla plechy *Cetraria aculeata* (wzór 4.20). Do danych doświadczalnych dopasowano model Denta (zielona linia ciągła), oraz model BET (czerwona linia ciągła).

Parabola dopasowana do danych modelem Denta jest bliższa danym doświadczalnym oraz dla $h = 1$ ma wartość znacząco wyższą niż zero, dane doświadczalne są więc znacznie lepiej opisane przez model Denta.

Tabela 9.3 przedstawia parametry otrzymane z dopasowania obu modeli teoretycznych do uzyskanych danych izotermy sorpcyjnej dla *Cetraria aculeata*.

		Model Denta	Model BET
Forma sigmoidalna	$\Delta M/m_0$	0.0457 ± 0.0032	0.022 ± 0.021
	B	0.9577 ± 0.0032	1
	$1/b_1$ [%]	0.9	0
Forma paraboliczna	A	0.18 ± 0.30	0 ± 0.63
	B	21.6 ± 1.4	-
	C	20.8 ± 1.3	24.0 ± 1.2

Tabela 9.3. Parametry izotermy sorpcyjnej dopasowanej według modelu Denta i BET dla plechy *Cetraria aculeata*.

Masa wody nasycająca pierwotne miejsca wiążące w plesze *Cetraria aculeata* wynosi $\Delta M/m_0 = 0.0457 \pm 0.0032$. Jest to nieco mniejsza wartość niż dla listkowatych porostów z rodziny Umbilicaria, jednakże znacząco mniej niż w przypadku innych krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych (Tabela 9.4).

Parametr b , charakterystyczny dla modelu Denta, oznaczający spadek względnej populacji miejsc wiążących wraz ze wzrastającą liczbą warstw wody związanej, wynosi 0.96. Jego wartość jest większa od uzyskanych dla innych grzybów zlichenizowanych (Tabela 9.4), co sugeruje potencjalnie większą stosowalność prostszego modelu BET (dla którego jest $b = 1$).

Grzyb zlichenizowany	$\Delta M/m_0$	b	$1/b_1$ [%]
<i>Umbilicaria aprina</i>	0.054	0.941	0.02
<i>Umbilicaria decussate</i>	0.054	0.914	0.53
<i>Himantormia lugubris</i>	0.071	0.854	1.11
<i>Usnea aurantiaco-atra</i>	0.068	0.873	1.46
<i>Umbilicaria antarctica</i>	0.073	0.871	0.09
<i>Cladonia mitis</i> 98	0.069	0.871	2.44
<i>Ramalina terebrata</i>	0.046	0.941	0.6

Tabela 9.4. Parametry izotermy sorpcyjnej dla wybranych gatunków grzybów zlichenizowanych. Dane pochodzą z: [Harańczyk i in., 2008] oraz [Harańczyk 2003].

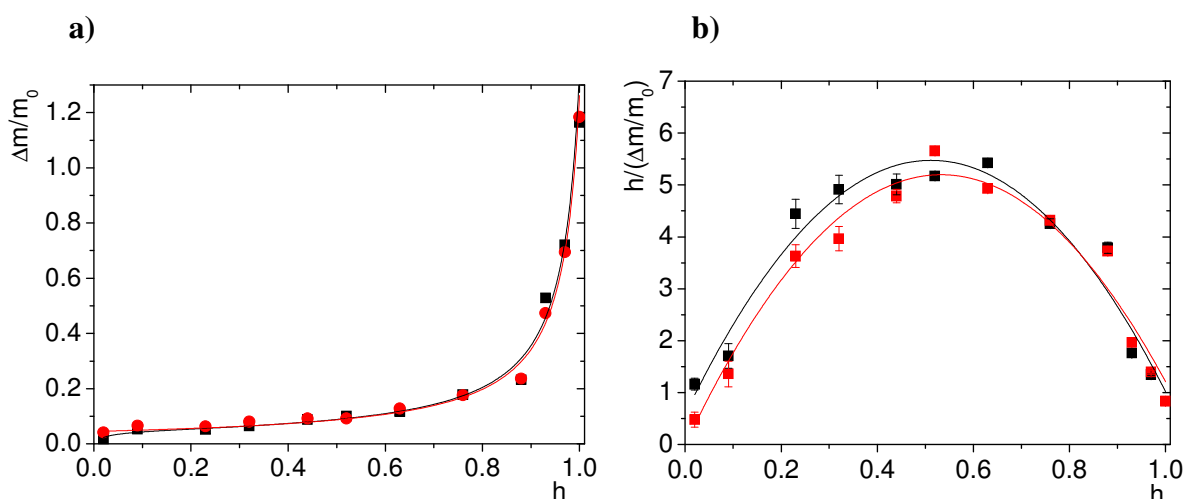
Miarą hydrofobowości plechy *Cetraria aculeata* jest wartość parametru $1/b_1 = 0.84\%$, która oznacza udział nieobsadzonych pierwotnych miejsc wodę dla $h = 1$. Hydrofobowość plech *Cetraria aculeata* jest większa niż tych z gatunków *Himantormia lugubris*, *Usnea aurantiaco-atra*, czy *Cladonia mitis* 98, natomiast jest na podobnym poziomie co w przypadku grzybów z rodzin Umbilicaria.

Na podstawie danych uzyskanych z kinetyk hydratacji, skonstruowano izotermy sorpcyjne dla plech martwych. Do danych doświadczalnych dopasowano model Denta izotermy sorpcyjnej, jako ten, który lepiej opisuje zależność ilości wody zaadsorbowanej na powierzchni plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* od wilgotności względnej. Poziomy wysycenia dla poszczególnych wilgotności względnych przedstawia Tabela 9.5.

wilgotność względna, h	$C^h = \sum_i A_i^h$, dzień słoneczny	$C^h = \sum_i A_i^h$, dzień pochmurny
0.02	0.0417±0.0011	0.0172±0.0019
0.09	0.0662±0.0036	0.0527±0.0032
0.23	0.0634±0.0021	0.0517±0.0031
0.32	0.0807±0.0032	0.0651±0.0024
0.44	0.0919±0.0016	0.0878±0.0040
0.52	0.0919±0.0012	0.1005±0.0026
0.63	0.1278±0.0042	0.1161±0.0053
0.76	0.1760±0.0038	0.1785±0.0035
0.88	0.2362±0.0051	0.2322±0.0063
0.93	0.4733±0.0043	0.5286±0.0045
0.97	0.6944±0.0051	0.7215±0.0051
1	1.1841±0.0023	1.1643±0.0018

Tabela 9.5 Zestawienie nasyceniowych poziomów hydratacji dla martwych plech *Cetraria aculeata* zebranych w dzień słoneczny i pochmurny w zależności od wilgotności względnej, w której plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* były hydratowane.

Rysunek 9.6 przedstawia zebrane dane w formie sigmoidalnej oraz - po przekształceniu zgodnie z warunkiem (4.20) – w formie parabolicznej wraz z dopasowaniami odpowiednich krzywych.



Rys. 9.6. Izoterma sorpcyjna skonstruowana dla martwych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* **a)** w formie sigmoidalnej, **b)** w formie parabolicznej. ■ - dane dla plech zebranych w dzień słoneczny, ■ - dane dla plech zebranych w dzień pochmurny,

Parametry dopasowania przedstawia Tabela 9.6. Dla dopasowań w formie parabolicznej przeliczono otrzymane współczynniki A , B , C na parametry $\Delta M/m_0$, b , $1/b_1$.

		Dzień pochmurny	Dzień słoneczny
Forma sigmoidalna	$\Delta M/m_0$	0.0470 ± 0.0056	0.0466 ± 0.0023
	b	0.9652 ± 0.0086	0.9612 ± 0.0020
	$1/b_1$ [%]	2.2 ± 5.8	0.0396 ± 1.1
Forma paraboliczna	A	0.58 ± 0.38	0 ± 0.37
	B	19.1 ± 1.8	19.5 ± 1.6
	C	18.7 ± 1.7	18.3 ± 1.5
	$\Delta M/m_0$	0.049 ± 0.044	0.051 ± 0.027
	b	0.95 ± 0.30	0.94 ± 0.28
	$1/b_1$ [%]	2.9 ± 1.8	0 ± 1.9

Tabela 9.6. Parametry dopasowania modelu Denta w formie sigmoidalnej oraz w formie parabolicznej dla martwych plech *Cetraria aculeata* zebranych w dzień pochmurny i dzień słoneczny.

Parametry dopasowania dla plech zebranych w dzień pochmurny i słoneczny są takie same poza $1/b_1$, który wynosi 2.2% (2.9% - wyliczone na podstawie dopasowania formy parabolicznej izotermy sorpcyjnej) dla plech zebranych w dzień pochmurny oraz 0.04% (0% - wyliczone na podstawie formy parabolicznej) dla plech zebranych w dzień słoneczny. Stosunek obsadzeni pustych miejsc do miejsc, które wiążą jedną molekułę wody jest większy

dla plech zebranych w dzień pochmurny co wskazuje, że ich powierzchnia jest bardziej hydrofobowa.

9.4 Pomiary relaksacyjne żywych plech *Cetraria aculeata*

Pomiary relaksacji ^1H -MRJ dla plechy *Cetraria aculeata* przeprowadzono w pełnym zakresie hydratacji uzyskiwanej z fazy gazowej ($\Delta m/m_0 = 0.041 - 0.812$).

W funkcji zaniku swobodnej precesji (FID) można wyróżnić składową pochodzącą od matrycy stałej plechy oraz od jednej lub więcej frakcji wody związanej w plesze.

W zależności od poziomu uwodnienia plechy, dane doświadczalne dopasowano trzema różnymi funkcjami:

- (i) dla najniższych poziomów uwodnień: ($\Delta m/m_0 = 0.041 - 0.072$) sygnał od protonów matrycy stałej plechy został opisany funkcją Abragama, natomiast wyodrębniono jedną składową wody związanej o krótkim czasie relaksacji T_2^* natomiast:

$$FID(t) = y_0 + Se^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} \frac{\sin at}{at} + Le^{-\frac{t}{T_{2L}^*}}, \quad (9.5)$$

- (ii) dla wyższych uwodnień ($\Delta m/m_0 = 0.101 - 0.181$) sygnał pochodzący od protonów ciała stałego jest nadal dobrze opisany funkcją Abragama; udało się też wyodrębnić dwie (zanikające eksponencjalnie) składowe cieczowe różniące się czasami relaksacji, a pochodzące od protonów wody związanej o różnym stopniu unieruchomienia;

$$FID(t) = y_0 + Se^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} \frac{\sin at}{at} + L_1 e^{-\frac{t}{T_{2L1}^*}} + L_2 e^{-\frac{t}{T_{2L2}^*}}, \quad (9.6)$$

- (iii) wreszcie dla plech o wysokiej hydratacji: ($\Delta m/m_0 = 0.200 - 0.812$) wyodrębniono dwie składowe pochodzące od mobilnych protonów, natomiast sygnał od protonów matrycy stałej plechy opisano funkcją Gaussa:

$$FID(t) = y_0 + Se^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} + L_1 e^{-\frac{t}{T_{2L1}^*}} + L_2 e^{-\frac{t}{T_{2L2}^*}}. \quad (9.7)$$

Stała y_0 obecna w równaniach (9.5 – 9.7) składową stałą zmierzonej siły elektromotorycznej, a wynikającą z ustawienia odbiornika. Jej wartość $y_0 \neq 0$ określa jedynie stopień wystrojenia spektrometru, nie sygnał od próbki.

9.4.1. Opis sygnału stałego

W analizie efektów hydratacji suchego układu biologicznego metodą MRJ należy uwzględnić zmiany sygnału wywołane różnym wystrojeniem spektrometru. Aby uniknąć błędów wprowadzanych przez różnice we wzmacnieniu sygnału czy wystrojeniu spektrometru, wygodnie jest wyrażać sygnał cieczowy w jednostkach sygnału stałego. W domenie czasu będzie to stosunek amplitudy sygnału cieczowego do sygnału stałego, L/S . Skłania to do szczególnie dużej staranności w wyznaczeniu szybko (w porównaniu do czasu martwego spektrometru) relaksującego sygnału stałego.

9.4.1.1 Solid echo

Dokładne określenie kształtu i amplitudy sygnału pochodzącego od protonów ciała stałego możliwe jest przez zastosowanie pomiaru *solid echo*. Wówczas rejestrowany sygnał pochodzi jedynie od protonów szybko relaksujących (stałych).

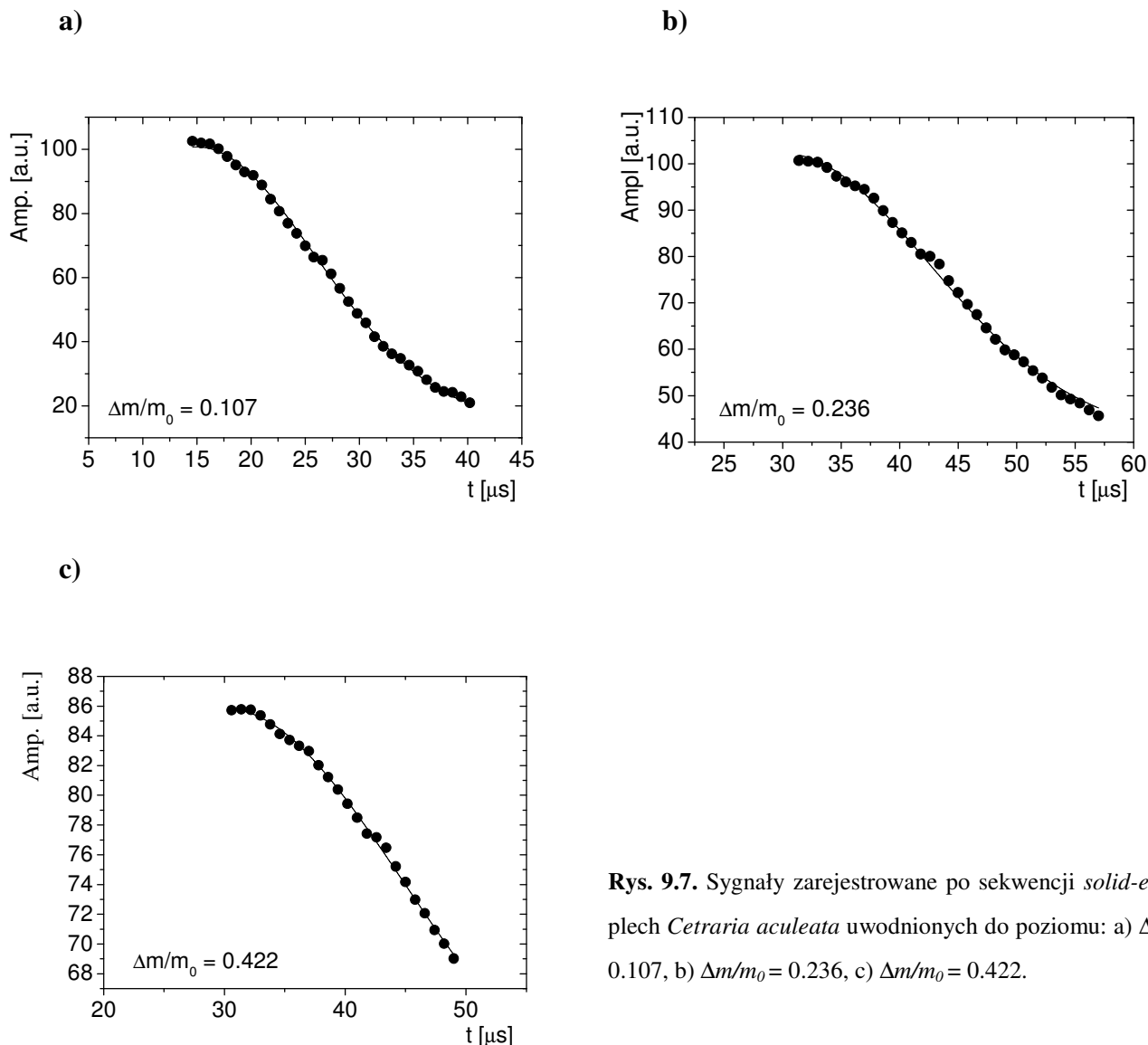
Wykonano pomiary *solid echo* dla wybranych trzech poziomów hydratacji: $\Delta m/m_0 = 0.107$, $\Delta m/m_0 = 0.236$, $\Delta m/m_0 = 0.422$. Ponieważ tą metodą mierzy się stosunkowo wąski zakres zmienności funkcji od składowej stałej sygnału, wystarczająco dokładnym przybliżeniem była tu funkcja Gaussa:

$$FID(t) = y_0 + SE e^{-\left(\frac{t-t_0}{T_G}\right)^2}, \quad (9.8)$$

gdzie SE to amplituda sygnału składowej stałej, T_G czas relaksacji charakteryzujący jej zanik, natomiast t_0 to położenie środka echa wyznaczone odległością między impulsami.

Naprzemiennie z eksperymentem *solid echo* wykonano pomiary sygnałów zaniku swobodnej precesji dla tych samych próbek. Celem była ocena, jak dalece amplituda składowej stałej sygnału od plechy, S , jest zmieniana w zwykłym pomiarze zaniku swobodnej precesji, kiedy dopasowanie jest wykonywane dla punktów pomiarowych zebranych dopiero

po odstępzie czasu martwego spektrometru. Rysunek 6.5 przedstawia sygnały uzyskane po sekwencji *solid echo*.



Rys. 9.7. Sygnały zarejestrowane po sekwencji *solid-echo* dla plech *Cetraria aculeata* uwodnionych do poziomu: a) $\Delta m/m_0 = 0.107$, b) $\Delta m/m_0 = 0.236$, c) $\Delta m/m_0 = 0.422$.

Wyniki prezentujące amplitudę funkcji Gaussa po obu typach sekwencji przedstawia Tabela 9.7. Ostatnia kolumna przedstawia względną różnicę między amplitudą wyznaczoną na podstawie sygnału FID oraz po sekwencji *solid echo*.

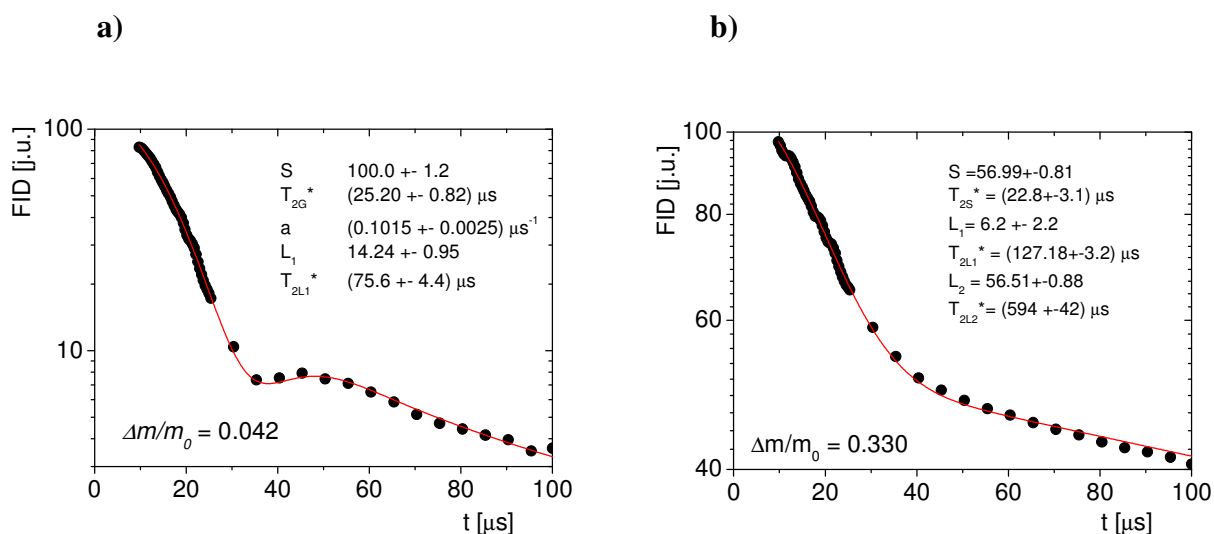
Różnice amplitud otrzymanych metodą *solid echo* oraz ze sygnału FID pozwalają na uznanie, że w sygnale zaniku swobodnej precesji amplituda składowej stałej sygnał jest właściwie określana.

Poziom uwodnienia, $\Delta m/m_0$	Amplituda sygnału po sekwencji <i>solid echo</i> , SE	Amplituda sygnału zaniku swobodnej precesji, S	$\frac{ S - SE }{SE} \cdot 100 [\%]$
0.107	86.1 ± 0.4	108.4 ± 1.1	25
0.236	61.0 ± 1.4	61.0 ± 0.4	0
0.422	29.3 ± 0.1	27.1 ± 0.4	8

Tabela 9.7. Zestawienie amplitud składowej stałej sygnału otrzymanych z funkcji swobodnej precesji (FID) oraz w sekwencji *solid-echo*.

9.4.1.2. Sygnał składowej stałej w funkcji FID

Składowa stała sygnału zaniku swobodnej precesji często wymaga bardziej złożonego opisu niż przybliżenia funkcją Gaussa. W wielu przypadkach dokładniejsze ujęcie wymaga zastosowania funkcji Abragama. Obecność iloczynu funkcji sincus i Gaussa w sygnale zaniku swobodnej precesji przejawiająca się jako tzw. *beat pattern* w sygnale FID [Derbyshire i in., 2004] – „falki” występującej w okolicy 40 μs .

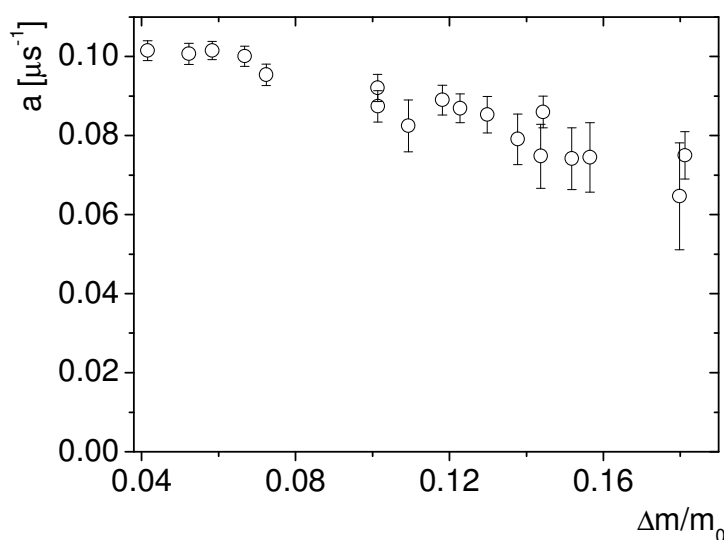


Rys. 9.8. Sygnał zaniku swobodnej precesji dla plech *Cetraria aculeata* uwodnionych do poziomu: **a)** $\Delta m/m_0 = 0.042$ – składowa stała dopasowana funkcją Abragama, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.330$ – opisana funkcją Gaussa.

Obecność charakterystycznej falki (*beat pattern*) w sygnałach zaniku swobodnej precesji może świadczyć o obecności fazy szklistej w badanych układach. Zgodnie z równaniem Gordona-Taylora [Gordon, Taylor, 1952; Crowe, 2002] temperatura przejścia szklistego w układach woda-cukier maleje wraz ze wzrostem uwodnienia. Podejrzuwając w

plewsze *Cetraria aculeata* znaczny udział węglowodanów, można jednak ocenić, że poziomy uwodnień plechy *Cetraria aculeata*, dla których część sygnału zaniku swobodnej precesji opisana była funkcją Abragama ($\Delta m/m_0 < 0.2$) były wyższe niż te, dla których temperatura przejścia szklistego jest większa lub równa pokojowej. Badania kalorymetryczne nie wykazały przejścia szklistego w zakresie $-60^{\circ}\text{C} - 24^{\circ}\text{C}$. Sugeruje to, że dla poziomów uwodnień plechy *Cetraria aculeata* niższych niż $\Delta m/m_0 = 0.2$ zastosowanie funkcji Abragama do opisu sygnału stałego jest wyrazem jego skomplikowanej struktury, a nie obecności fazy szklistej.

W funkcji Abragama, wartość parametru, a jest połową szerokości linii (w domenie częstości). Wraz z rosnącym poziomem hydratacji plechy wartość parametru a maleje od wartości około $0.1 \mu\text{s}^{-1}$ do wartości $0.07 \mu\text{s}^{-1}$ (Rys. 9.9), co odpowiada szerokości połówkowej linii w zakresie $\Delta\nu = 22.3 - 32 \text{ kHz}$.



Rys. 9.9. Zależność parametru a funkcji Abragama od poziomu uwodnienia plech *Cetraria aculeata*.

Dla wyższych poziomów uwodnień, udział składowej stałej w sygnale FID spada na koszt sygnału od protonów ciekłych. Z tego powodu dopasowanie funkcji Abragama staje się coraz trudniejsze. Wraz z rosnącym poziomem uwodnienia zwiększają się niepewności wyznaczenia parametru a funkcji Abragama. Wymuszone dopasowanie funkcji Abragama dla sygnałów o wyższym poziomie uwodnienia powodowało niefizyczne zmniejszanie parametru a aż do wartości rzędu $0.01 \mu\text{s}^{-1}$ oraz skracanie wartości czasu T_{2L}^* relaksacji poprzecznej składowej wody ściśle związanej do niefizycznych wartości $30 - 40 \mu\text{s}$. Wobec powyższego

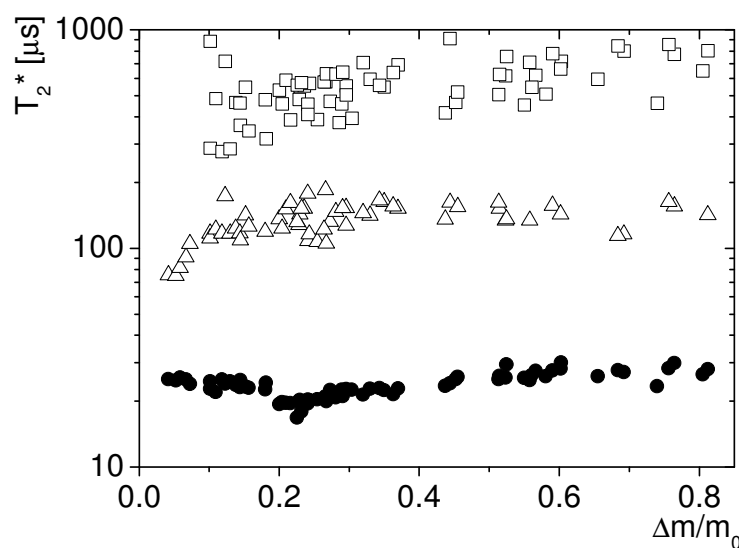
dla plech uwodnionych powyżej $\Delta m/m_0 = 0.2$ do opisu funkcji FID pochodzącej od protonów ciała stałego zastosowano funkcję Gaussa (9.7).

Czas relaksacji spinowo-spinowej składowej stałej sygnału zaniku swobodnej precesji dla badanych plech wynosił około $T_{2S}^* \approx 25 \mu s$ i tylko nieznacznie zmieniał się wraz z uwodnieniem plech (Rys. 9.10). Sugeruje to, że podczas procesu hydratacji matryca stała nie zmienia się znacząco. Można zatem wykorzystać amplitudę składowej stałej sygnału FID do skalowania cieczowej składowej sygnału FID, L/S . Otrzymane wartości czasów T_{2S}^* są zbliżone do zmierzonych w plechach innych gatunków grzybów zlichenizowanych, ale także w innych układach biologicznych takich jak ziarna zbóż, liofilizaty błon fotosyntetycznych, łyko, szkliwo zębów [Harańczyk, 2003], pokrywy chrząszczy [Harańczyk i in., 2012a], polimery DNA [Harańczyk i in., 2010]. Sugeruje to zbliżone szerokości połówkowe linii pochodzących od matrycy stałej plechy, a więc podobny rozkład pól lokalnych wewnątrz plechy [Pintar, 1991].

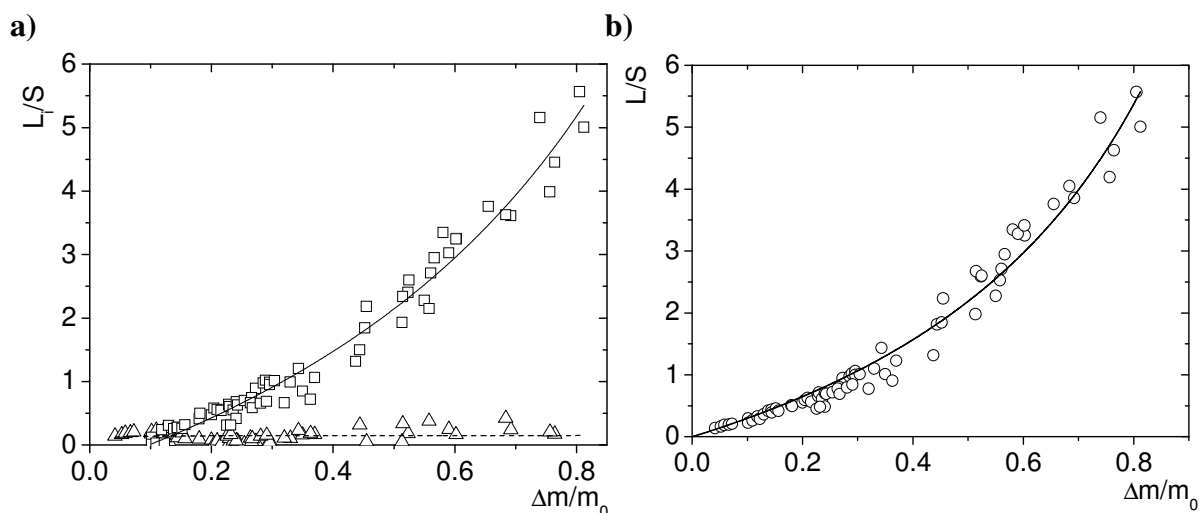
9.4.2. Hydratacyjna zależność sygnału cieczowego

W zakresie najniższych uwodnień plechy *Cetraria aculeata* ($\Delta m/m_0 = 0.041 - 0.072$) wyodrębniono jedną składową cieczową sygnału FID o czasie relaksacji T_{2LI}^* rosnącym od $76 \mu s$ do $105 \mu s$ wraz ze wzrostem uwodnienia plechy. Dla uwodnień przekraczających $\Delta m/m_0 = 0.101$ wyodrębniono dwie składowe cieczowe różniące się mobilnością, a mianowicie: sygnał pochodzący od protonów wody ściśle związanej oraz wody luźno związanej. Dwie składowe wody związanej są również obserwowane w plechach innych grzybów zlichenizowanych [Harańczyk i in., 2008]

Czasy relaksacji wszystkich składowych sygnału zaniku swobodnej precesji dla badanych plech zostały przedstawione na Rysunku 9.10.



Rys. 9.10. Czasy relaksacji spinowo-spinowej składowych funkcji FID zmierzone dla plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* w zależności od uwodnienia $\Delta m/m_0$ - składowa pochodząca od protonów ciała stałego (●), składowa pochodząca od wody ściśle związanej (△) oraz od wody luźno związanej (□).



Rys. 9.11. Hydratacyjna zależność amplitud składowych cieczowych sygnału MRJ wyrażonych w jednostkach amplitudy ciała stałego dla plech *Cetraria aculeata*, **a)** woda ściśle związana (△, linia przerywana), woda luźno związana (□, linia ciągła), **b)** całkowity sygnał cieczowy (○). Do danych dopasowano funkcje wymierne postaci (9.9).

Hydratacyjna zależność amplitudy sygnału pochodzącego od wody ściśle związanej wyrażonej w jednostkach amplitudy ciała stałego, L_I/S , nasycy się na poziomie $(L_I/S)_{max} = 0.150 \pm 0.013$. Przypomina to zachowanie frakcji wody związanych do pierwotnych miejsc wiążących wyróżnianych przez izotermę sorpcyjną.

Wraz z rosnącym poziomem hydratacji oprócz sygnału pochodzącego od wody ściśle związanej pojawia się sygnał pochodzący od wody luźno związanej. Zależność hydratacyjna

całkowitego sygnału pochodzącego od protonów cieczerwych wyrażona w jednostkach sygnału pochodzącego od stałej matrycy plechy, $(L_1+L_2)/S = L/S$, jest silnie nieliniowa (Rys. 9.11b). Do danych doświadczalnych dopasowano funkcję wymierną postaci:

$$\frac{L}{S}(\Delta m / m_0) = \frac{A \cdot \Delta m / m_0 + B}{1 + C \cdot \Delta m / m_0}, \quad (9.9)$$

gdzie $A = 2.75 \pm 0.11$, $B = 0 \pm 3 \cdot 10^{-6}$, $C = -0.738 \pm 0.027$. Współczynnik $B = \frac{L}{S}(0)$ jest miarą ilości wody zapuławkowanej w odwodnionej plesze, a niewykrywalnej metodami grawimetrycznymi. W plesze *Cetraria aculeata* nie zaobserwowano puli wody puławkowanej. Pula wody zapuławkowanej została zaobserwowana w liofilizowanych błonach fotosyntetycznych pszenicy [Harańczyk i in., 2006a].

9.4.2.1 Częściowe rozpuszczanie frakcji stałej

Nieliniowa zależność hydratacyjna składowej cieczerwych wyrażonej w jednostkach składowej stałej sygnału FID, $L/S(\Delta m/m_0)$, dla plechy *Cetraria aculeata* sugeruje obecność frakcji rozpuszczalnej w matrycy stałej plechy. Dotąd obecność frakcji stałej rozpuszczalnej stwierdzono w grzybach zlichenizowanych z gatunku *Umbilicaria aprina* i *Umbilicaria decussata* [Harańczyk i in., 2008], a także w łyku kasztanowca, gdzie wraz z narastającym uwodnieniem z fazy gazowej, frakcja rozpuszczalna ulega rozpuszczeniu w całości. W łyku *Aesculus hippocastanum* zależność hydratacyjna L/S dla wysokich poziomów hydratacji, stała się liniowa [Harańczyk i in., 1999].

W oparciu o opracowany model teoretyczny (Rozdział 3.4.8) na podstawie hydratacyjnych zależności L/S oraz L_1/S wyznaczono stężenie nasycenia frakcji stałej rozpuszczalnej. Do zebranych danych dopasowano zależności:

$$L/S(\Delta m / m_0) = k \cdot \frac{\left(1 + \gamma \frac{c_s}{1 - c_s}\right) \Delta m / m_0}{1 - \frac{\gamma}{\delta} \frac{c_s}{1 - c_s} \cdot \Delta m / m_0}, \quad (9.10)$$

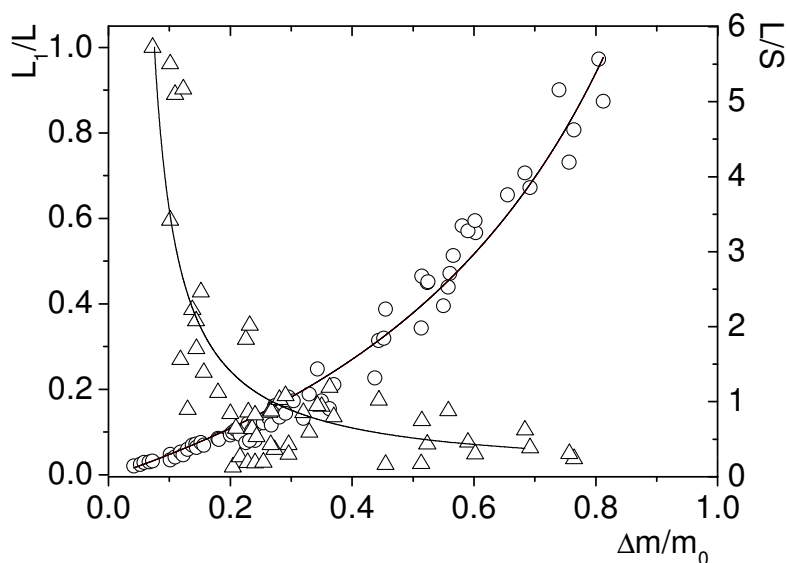
$$\frac{L_1}{L}(\Delta m / m_0) = \frac{\Delta M_1 / m_0}{\Delta M_1 / m_0 + \left(1 + \gamma \frac{c_s}{1 - c_s}\right) \cdot (\Delta m / m_0 - \Delta M_1 / m_0)} \quad (9.11)$$

Znaczenie występujących we wzorach parametrów opisano w Rozdziale 3.4.8.

Głównymi rozpuszczalnymi składnikami plech grzybów zlichenizowanych są wielocukry i wieloalkohole, którym jednocześnie przypisuje się istotne znaczenie w ochronie organizmów ekstremofilnych przed niską temperaturą i skrajnym odwodnieniem [Chapman i in., 1994; Harańczyk 2003]. Dlatego też w oparciu o dane zebrane w Tabeli 9.8 wyznaczono średnią wartość gęstości protonowych (w stosunku do gęstości protonowej wody) wielocukrów i wieloalkoholi występujących w przyrodzie: $\gamma = 0.657 \pm 0.083$ i wartość tę użyto wykonując jednoczesne dopasowanie L/S i L_I/S (z uwspólnieniem dopasowanych parametrów) w zależności od $\Delta m/m_0$ (Rys. 9.12).

Cukier / wzór sumaryczny	c_s	$\gamma = \frac{\rho_c}{\rho_{H_2O}}$	Wieloalkohol / wzór sumaryczny	c_s	$\gamma = \frac{\rho_c}{\rho_{H_2O}}$
Erytroza $C_4H_8O_4$	rozp.	0.601	Erytrytol $C_4H_{10}O_4$	0.40	0.738
Treozaz $C_4H_8O_4$	rozp.	0.601	Ksylitol $C_5H_{12}O_5$	0.39	0.711
Erytruloza $C_4H_8O_4$	0.48	0.601	Arabitol $C_5H_{12}O_5$	0.40	0.711
Arabinoza $C_5H_{10}O_5$	0.50	0.601	Rybitol $C_5H_{12}O_5$	0.48	0.711
Ryboza $C_5H_{10}O_5$	0.50	0.601	Galaktitol $C_6H_{14}O_6$	0.03	0.693
Ksyloza $C_5H_{10}O_5$	0.56	0.601	Sorbitol $C_6H_{14}O_6$	0.73	0.693
D-Glukozaz $C_6H_{12}O_6$	0.48	0.601	Mannitol $C_6H_{14}O_6$	0.15	0.693
Gruktoza $C_6H_{12}O_6$	0.44	0.601	Glikol $C_2H_6O_2$	rozp.	0.872
Mannoza $C_6H_{12}O_6$	0.71	0.601	Glicerol $C_3H_8O_3$	rozp.	0.783
Galaktoza $C_6H_{12}O_6$	0.67	0.601			
Taloza $C_6H_{12}O_6$	0.09	0.601			
Sacharoza $C_{12}H_{22}O_{11}$	0.67	0.580			
Trehaloza $C_{12}H_{22}O_{11}$	0.41	0.580			

Tabela 9.8. Stężenia nasycenia, c_s , i gęstość protonowa cukrów i wieloalkoholi występujących w przyrodzie, wyrażona w jednostkach gęstości protonowej wody, γ . *rozp* – dobrze rozpuszczalny w dużych ilościach. Dane pochodzą z *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*, (1996, 2006).



Rys. 9.12. Łączone dopasowanie hydratacyjnych zależności frakcji wody ściśle związanej wyrażonej w jednostkach całkowitej puli wody, L_1/L ($\triangle$) oraz całkowitej puli wody wyrażonej w jednostkach amplitudy sygnału ciała stałego, L/S ($\circ$) [zależności (9.10) i (9.11)].

Masa wody ściśle związanej (składowa L_1 sygnału MRJ) wynosi $\Delta M_1/m_0 = 0.0753 \pm 0.0062$, a uśredniona wartość stężenia nasycenia substancji rozpuszczonych budujących matrycę grzyba zlichenizowanego *Centraria aculeata* wynosi: $c_s = 0.57 \pm 0.12$. Średnia gęstość protonowa nierozpuszczalnej frakcji stałej w stosunku do gęstości protonowej wody wynosi: $\delta = 1.20 \pm 0.62$. Współczynnik proporcjonalności wyniósł: $k = 1.46 \pm 0.34$. Wyznaczone stężenie nasycenia frakcji stałej rozpuszczalnej odpowiada grupie wielocukrów do której należą: sacharoza, galaktoza, ksyloza, ryboza i arabinoza. Najczęściej z nich występującym w plechach grzybów zlichenizowanych jest sacharoza [Roser i in., 1992]. Aby sprawdzić, czy ta zbieżność jest rzeczywista, czy tylko przypadkowa, wykonano oznaczenia zawartości węglowodanów w dehydratowanej plesze grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*, których wyniki przedstawia Tabela 9.9.

Cukier / wzór sumaryczny	Oznaczone stężenie [$10^{-3} \cdot \%$]	Wieloalkohol / wzór sumaryczny	Oznaczone stężenie [$10^{-3} \cdot \%$]
Sacharoza / $C_{12}H_{22}O_{11}$	1.23 ± 0.05	Arabitol $C_5H_{12}O_5$	16.50 ± 0.74
Fruktoza / $C_6H_{12}O_6$	0.203 ± 0.004	Mannitol $C_6H_{14}O_6$	2.39 ± 0.08
Trehaloza / $C_{12}H_{22}O_{11}$	0.153 ± 0.003	Myo-inozytol / $C_6H_{12}O_6$	0.82 ± 0.03
Glukoza / $C_6H_{12}O_6$	0.085 ± 0.004		

Tabela 9.9. Zawartość wielocukrów i wieloalkoholi w dehydratowanej plesze *Cetraria aculeata*.

Faktycznie, dominującym składnikiem wśród wielocukrów okazała się sacharoza, a pośród wieloalkoholi arabitol, jednakże stężenia tych substancji oznaczone w plesze badanego grzyba zlichenizowanego są przynajmniej o trzy rzędy wielkości za małe, aby wywołać efekt rozpuszczenia matrycy stałej na obserwowaną skalę.

Aby potwierdzić obserwowany efekt „nadmiarowego” narastania sygnału MRJ w stosunku do uwodnienia plech wykonano pomiary w ^1H -MRJ w domenie częstości.

9.5. Pomiary relaksacyjne martwych plech *Cetraria aculeata*

Hydratacyjne pomiary relaksacyjne martwych komórek plechy grzyba zlicheniozwanego *Cetraria aculeata* zostały przeprowadzone w zakresie uwodnień $\Delta m/m_0 = 0.042 - 0.762$ dla plech zebranych w dzień pochmurny oraz $\Delta m/m_0 = 0.031 - 0.736$ dla plech zebranych w dzień słoneczny. W opisie sygnałów zaniku swobodnej precesji FID, podobnie jak w przypadku komórek żywych, zastosowano trzy modele, które podsumowuje Tabela 9.10:

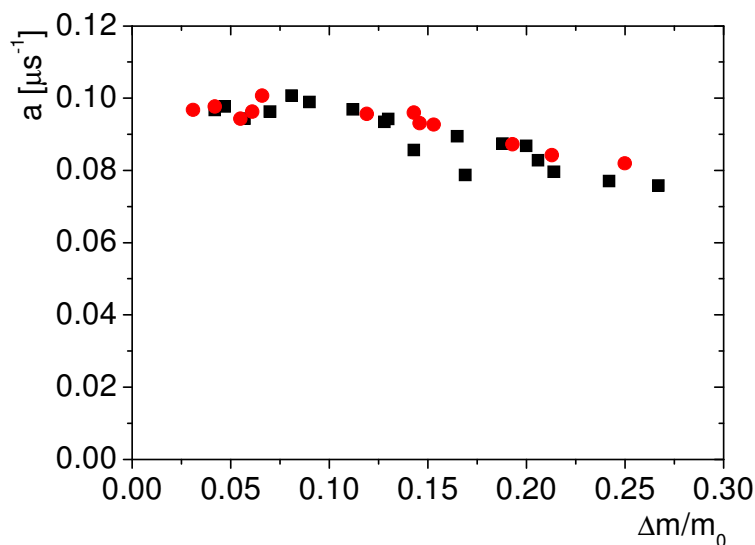
Stosowany model	Zakres uwodnień (dzień słoneczny)	Zakres uwodnień (dzień pochmurny)
Funkcja Abragama oraz jedna funkcja eksponencjalna (równanie (9.5))	0.031 – 0.066	0.042 – 0.090
Funkcja Abragama i dwie składowe eksponencjalne (równanie (9.6))	0.119 – 0.250	0.112 – 0.267
Funkcja Gaussa i dwie składowe eksponencjalne (równanie (9.7))	0.294 – 0.736	0.341 – 0.762

Tabela 9.10. Modele użyte do opisu funkcji FID martwych plech *Cetraria aculeata*

9.5.1. Sygnał pochodzący od protonów matrycy stałej

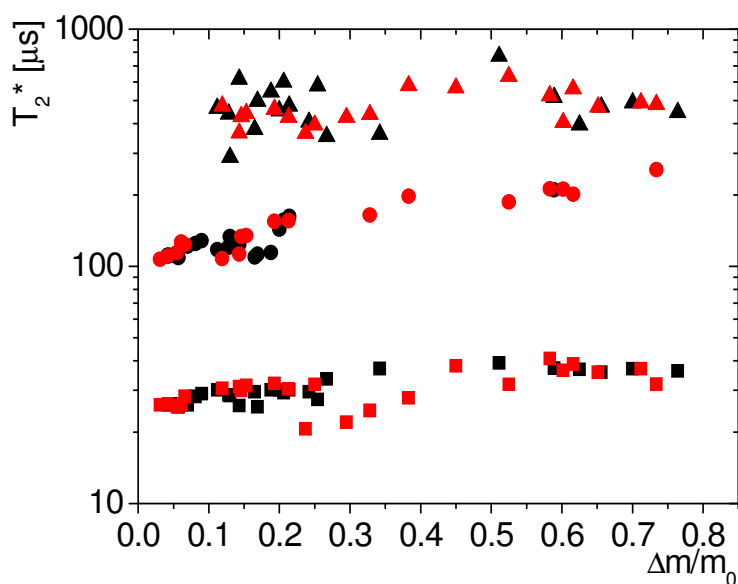
Sygnał zaniku swobodnej precesji dla części pochodzącej od protonów ciała stałego dla niskich uwodnień opisany jest funkcją Abragama. W miarę przyrostu ilości wody związanej

w plesze, „falka” w sygnale FID staje się słabo widoczna, a część sygnału FID pochodząca od protonów ciała stałego opisywana jest funkcją Gaussa.



Rys. 9.13. Wartość parametru a funkcji Abragama dla badanych próbek w zależności od poziomu ich uwodnienia. ● - plechy zebrane w dzień słoneczny, ■ - plechy zebrane w dzień pochmurny.

Wraz ze zwiększającym się stopniem uwodnienia parametr a funkcji Abragama maleje od wartości rzędu $0.10 \mu s^{-1}$ (co odpowiada szerokości linii 32 kHz) do około $0.08 \mu s^{-1}$ (25 kHz), co świadczy o procesie „rozmiękania” matrycy stałej plechy. Otrzymane wartości są porównywalne z wartościami otrzymanymi dla komórek żywych.



Rys. 9.14. Hydratacyjna zależność czasów relaksacji poprzecznej składowych sygnału FID: ■, ● - stałej, ▲, ● - ciekowej pochodzącej od protonów wody ściśle związanej, ▲, ● - ciekowej pochodzącej od protonów wody luźno związanej. Kolor czerwony – plechy zebrane w dzień słoneczny, kolor czarny – w dzień pochmurny.

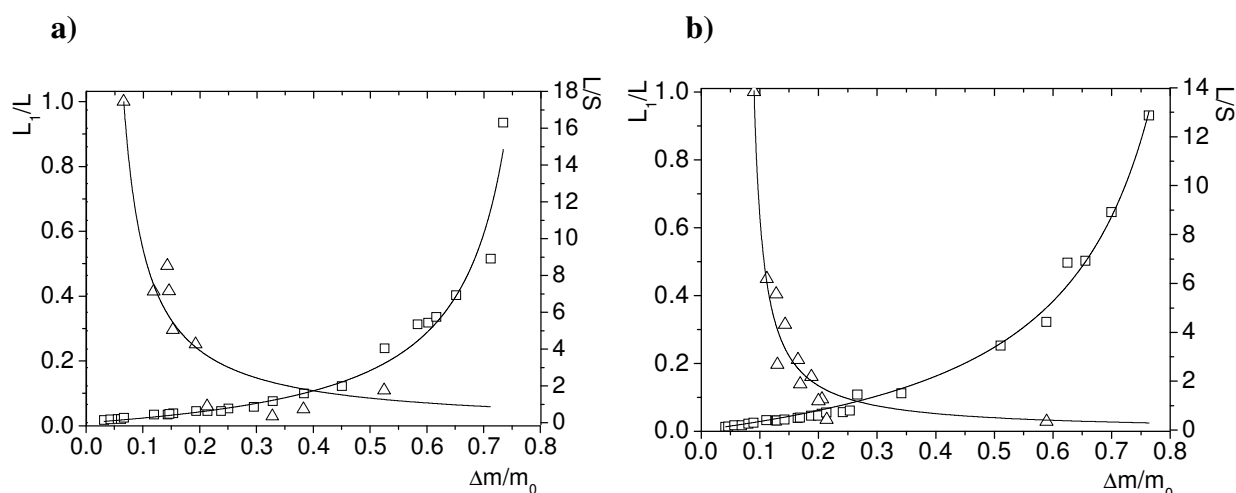
Relaksacja poprzeczna składowej stałej sygnału FID opisana jest przez czas relaksacji poprzecznej wynoszący, podobnie jak w przypadku komórek żywych, $T_{2S}^* \approx 25 \mu s$ i bardzo słabo zmienny wraz z uwodnieniem plechy. Spadek wartości czasu T_{2S}^* dla plech zebranych w dzień słoneczny dla uwodnień około $\Delta m/m_0 = 0.25$ prawdopodobnie wiąże się ze zmianą modelu, którym opisano część funkcji FID pochodzącą od protonów matrycy stałej i nie jest odbiciem procesów fizycznych.

Zmierzone czasy relaksacji poszczególnych składowych FID dla komórek żywych i martwych nie różnią się od siebie, co potwierdza wyciągnięte na podstawie wyników badań w domenie czasu wnioski, że proces zatrzymania funkcji życiowych grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* nie wpłynął w znaczący sposób na jego matrycę stałą.

9.5.2. Składowa cieczowa sygnału FID

Hydratacyjną zależność czasów relaksacji poszczególnych składowych sygnału FID plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* przedstawia Rysunek 9.14. W obszarze niskich uwodnień ($\Delta m/m_0 < 0.090$ dla plech zebranych w dzień pochmurny oraz $\Delta m/m_0 < 0.066$ w dzień słoneczny) wyodrębniono jedną składową cieczową o średnim czasie relaksacji T_{2LI}^* równym $120 \mu s$. Dla plech bardziej uwodnionych wyodrębniono dwie składowe cieczowe sygnału zaniku swobodnej precesji. W zakresie uwodnień powyżej $\Delta m/m_0 = 0.2$ z powodu problemów numerycznych z wyodrębnieniem składowej krótkoczasowej (woda ściśle związana) – w szczególności w przypadku plech zebranych w dzień pochmurny – w części przypadków z sygnału FID wyodrębniono jedną, uśrednioną składową cieczową.

Analiza hydratacyjnych zależności amplitud składowych cieczowych sygnału FID ujawniła, że amplituda sygnału pochodzącego od wody ściśle związanej mierzona w jednostkach amplitudy sygnału stałego ulega wysyceniu na poziomie $(L_I/S)_{\max} = 0.102 \pm 0.023$ dla plech zebranych w dzień słoneczny oraz $(L_I/S)_{\max} = 0.114 \pm 0.016$ dla plech zebranych w dzień pochmurny. Ponadto amplituda całkowitego sygnału cieczowego, L/S , rośnie nieliniowo wraz z uwodnieniem plech. Zarówno w przypadku plech zebranych w dzień pochmurny jak i słoneczny do zebranych danych dopasowano model jednoczesnego dopasowania zależności L/S ($\Delta m/m_0$) oraz L_I/S ($\Delta m/m_0$) z uwspólnieniem parametrów [równania (9.10) oraz (9.11)]. Wynik dopasowania obrazuje Rysunek 9.15.



Rys. 9.15. Hydratacyjna zależność całkowitej amplitudy sygnału cieczowego L/S ($\square$) oraz składowej krótkoczasowej L_p/S ($\triangle$) wyrażonych w jednostkach amplitudy ciała stałego wraz z dopasowaniami w oparciu o równania (9.10) i (9.11) dla martwych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zebranych w dzień **a)** słoneczny, **b)** pochmurny.

Tabela 9.11 prezentuje zestawienie parametrów dopasowania:

Parametr	Plech zebrane w dzień słoneczny	Plech zebrane w dzień pochmurny
$\Delta M_l/m_0$	0.068 ± 0.014	0.077 ± 0.011
c_s	0.781 ± 0.050	0.601 ± 0.093
δ	1.32 ± 0.42	1.14 ± 0.54
k	0.863 ± 0.071	1.42 ± 0.24

Tabela 9.11. Parametry dopasowania krzywych opisanych równaniami (9.10) i (9.11) do danych doświadczalnych zebranych na Rysunkach 9.15 i 9.16.

Wyniki badania $^1\text{H-MRJ}$ w domenie czasu (spójnie z wynikami otrzymanymi w domenie częstości) pokazały, że poziom fotosyntezy może mieć wpływ na zawartość substancji rozpuszczalnych w plesze grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*, bowiem plechy zebrane w dzień pochmurny charakteryzują się mniejszym stężeniem nasycenia substancji rozpuszczających się niż zebrane w dzień słoneczny.

9.6 Spektroskopia $^1\text{H-MRJ}$ żywych plech *Cetraria aculeata*

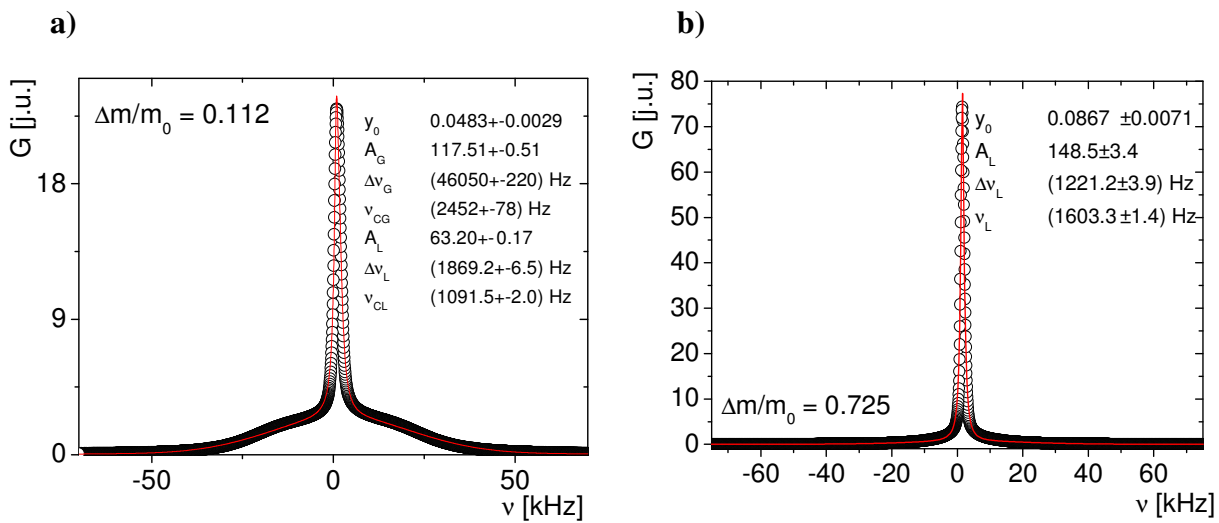
Widma $^1\text{H-MRJ}$ dla plech grzyba zlichenizowanego zarejestrowano w pełnym zakresie uwodnień uzyskiwanych z fazy gazowej ($\Delta m/m_0 = 0.038$ do $\Delta m/m_0 = 0.771$).

Dla hydratacji niższych od $\Delta m/m_0 < 0.520$ wyodrębniono składową stałą widma opisaną funkcją Gaussa oraz jedną, uśrednioną składową cieczową opisaną funkcją Lorentza:

$$G(\nu) = y_0 + \frac{A_G}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_G} \exp \left[-2 \cdot \left(\frac{\nu - \nu_G}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_G} \right)^2 \right] + \frac{2A_L}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_L}{4 \cdot (\nu - \nu_L)^2 + \Delta \nu_L^2} \right], \quad (9.12)$$

gdzie: y_0 to składowa stała sygnału (efekt aparaturowy).

Dla wyższych poziomów hydratacji plech, sygnał cieczowy znacząco wzrasta i prawdopodobnie dlatego nie udało się wyodrębnić składowej stałej. Rysunek 9.16. przedstawia przykłady widm dla dwóch wybranych poziomów uwodnienia ($\Delta m/m_0 = 0.112$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.725$).



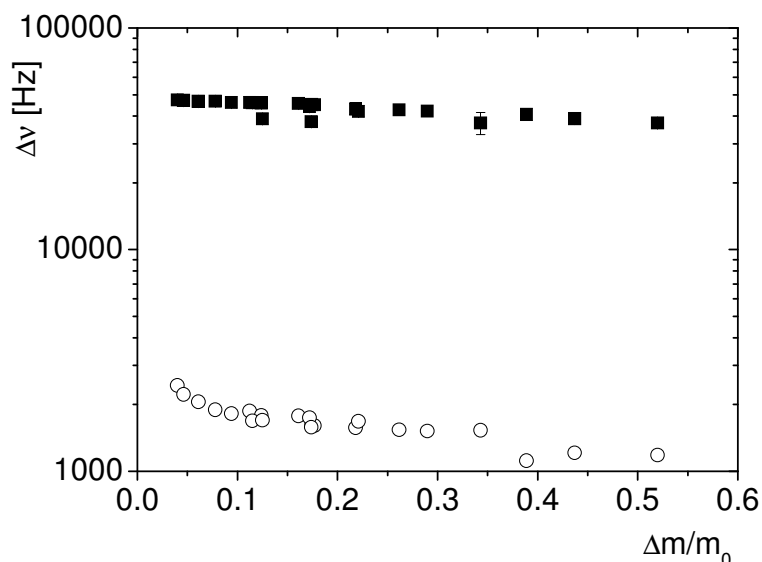
Rys. 9.16. Widmo ^1H -MRJ plechy *Cetraria aculeata* uwodnionej do poziomu **a)** $\Delta m/m_0 = 0.112$ a opisanie złożeniem funkcji Gaussa i Lorentza, oraz **b)** uwodnione do $\Delta m/m_0 = 0.725$, opisanie funkcją Lorentza o szerokości połówkowej około 1600 Hz.

Składowa widma ^1H -MRJ pochodząca od matrycy stałej plechy *Cetraria aculeata* opisana jest szeroką linią wystarczająco dobrze opisywaną funkcją Gaussa ($\Delta \nu_G \approx 45 \text{ kHz}$, co odpowiada polom lokalnym $\Delta B_{\text{lok}} \approx 1 \text{ mT}$). Szerokość połówkowa linii nieznacznie zmniejsza się wraz z uwodnieniem plech. W obszarze uwodnień, w których możliwe było wyodrębnienie składowej stałej, jej zmiany te są bardzo niewielkie (Rys. 9.17), pole powierzchni pod pikiem Gaussa proporcjonalne do liczby spinów składowej stałej plechy może być jednostką służącą do normalizacji amplitudy sygnału pochodzącego od mobilnych protonów cieczowych.

Dokładna analiza linii składowej stałej widma ujawnia jej bardziej skomplikowany kształt. Funkcja Gaussa modyfikowana jest funkcją schodkową, której obecność jest dobrze widoczna dla niskich poziomów hydratacji, co odpowiada funkcji Abragama w domenie

czasu. Szczegółowa, jakościowa analiza składowej stałej sygnału została przeprowadzona w domenie czasu.

Dla badanych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zarejestrowano jedną, uśrednioną składową cieczową, do której dopasowano funkcję Lorentza. Dla niskich poziomów uwodnień szerokość połówkowa linii Lorentza wynosi około 2200 Hz, co odpowiada wartości około 140 μ s w domenie czasu – odpowiada protonom wody ściśle związanej. Dla większych wartości uwodnień plechy, szerokości połówkowe linii Lorentza maleją do wartości około 1000 Hz odpowiadając uśrednionemu sygnałowi od protonów wody ściśle i luźno związanej.



Rys. 9.17. Szerokości połówkowe obu linii składowych widma ^1H -MRJ dla plech *Cetraria aculeata*: (składowa stała: ■ - dopasowana krzywą Gaussa, składowa mobilna: ○ - dopasowana krzywą Lorentza).

Zależność hydratacyjna stosunku sygnału cieczowego (pole pod linią Lorentza) wyrażonego w jednostkach sygnału stałego (pole pod linią Gaussa i Lorentza, A_L/A_G), jest nieliniowa.

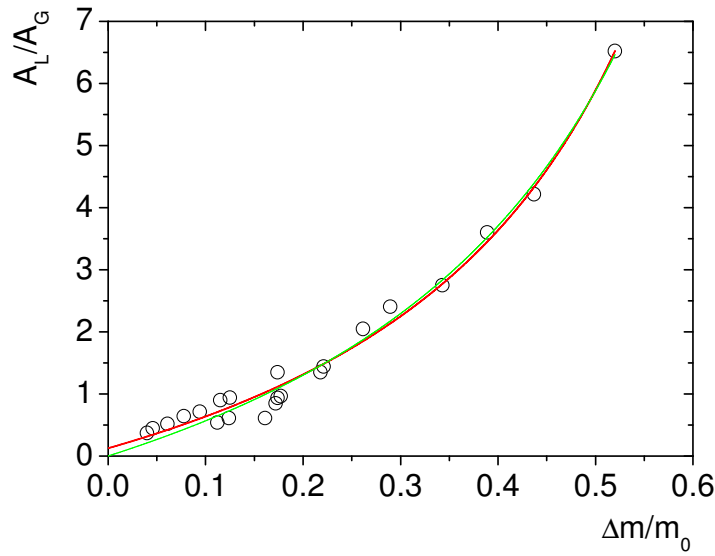
Do danych doświadczalnych dopasowano funkcję wymierną postaci:

$$\frac{A_L}{A_S}(\Delta m/m_0) = \frac{A \cdot \Delta m/m_0 + B}{1 + C \cdot \Delta m/m_0}, \quad (9.13)$$

gdzie parametry dopasowania wynoszą: $A = 4.33 \pm 0.50$, $B = 0.125 \pm 0.084$, $C = -1.222 \pm 0.067$. Wartość współczynnika $B = \frac{A_L}{A_S}(\Delta m/m_0 = 0)$ jest miarą ilości wody

zapołapkowanej w plesze, niewykrywalnej metodami grawimetrycznymi. Można ją wyrazić

poprzez wyznaczenie bezwzględnej wartości miejsca zerowego funkcji $\frac{A_L}{A_S}(\Delta m/m_0)$. Ilość wody zapuławkowanej w badanych plechach wyznaczona metodą pomiarów MRJ w domenie częstości wynosi: $\Delta m/m_{0tr} = 0.029 \pm 0.023$. Duża niepewność wyniku wiąże się z trudnościami numerycznymi w dopasowaniu funkcji Gaussa do stałej części widma MRJ. Wydaje się, że stwierdzenie o braku frakcji wody zapuławkowanej wynikające z pomiarów w domenie czasu wydaje się bliskie prawdy.



Rys. 9.18. Hydratacyjna zależność sygnału cieczowego MRJ plechy *Cetraria aculeata* (pola pod pikiem Lorentza liczona w jednostkach pola pod pikiem Gaussa). Do punktów pomiarowych dopasowano funkcję wymierną (9.13) - linia czerwona oraz wymierną zależność (9.14) – linia zielona.

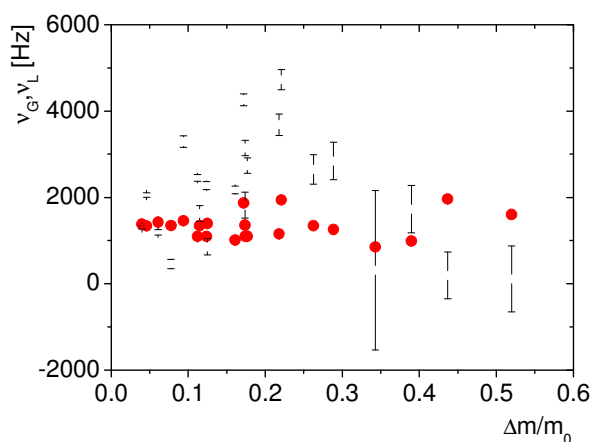
Nieliniowa zależność A_L/A_G w funkcji poziomu hydratacji plechy potwierdza hipotezę o obecności frakcji rozpuszczalnej w plesze *Cetraria aculeata*. Do zależności hydratacyjnej sygnału cieczowego dopasowano więc analogiczną zależność, jak dla danych zebranych w domenie czasu :

$$\frac{A_L}{A_S}(\Delta m/m_0) = k \cdot \frac{\left(1 + \gamma \frac{c_s}{1 - c_s}\right) \Delta m/m_0}{1 - \frac{\gamma}{\delta} \frac{c_s}{1 - c_s} \cdot \Delta m/m_0}, \quad (9.14)$$

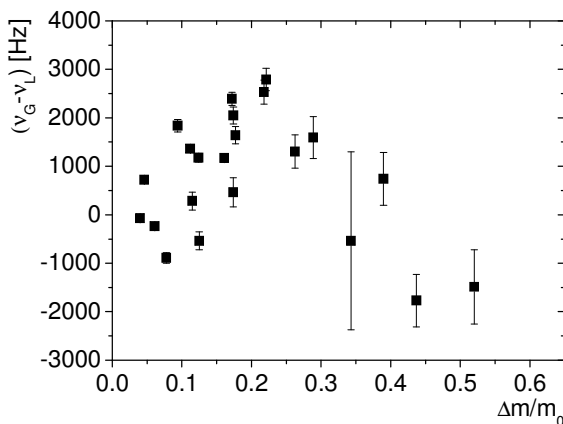
Otrzymano wartość stężenia nasycenia równą $c_s = 0.62 \pm 0.11$, $\delta = 0.93 \pm 0.31$, a współczynnik proporcjonalności wyniósł $k = 2.43 \pm 0.82$. Otrzymane stężenie nasycenia w

granicach niepewności pomiarowych jest zgodne z tym otrzymanym na podstawie danych zebranych w domenie czasu ($c_s = 0.57 \pm 0.12$).

Rysunek 9.19 przedstawia położenia pików Gaussa i Lorentza w funkcji uwodnienia plechy *Cetraria aculeata*. Średnie położenie pików Lorentza jest przesunięte o około 1300 Hz w kierunku wyższych częstotliwości niż rezonansowa dla swobodnych protonów (300.14 MHz). Położenie centrów pików Gaussa silniej zależy od poziomu uwodnienia.



Rys. 9.19. Położenia linii Gaussa (■) i Lorentza (●) w zależności od poziomu uwodnienia plechy *Cetraria aculeata*.



Rys. 9.20. Różnica między położeniami środków linii Gaussa i Lorentza w zależności od poziomu uwodnienia plechy *Cetraria aculeata*.

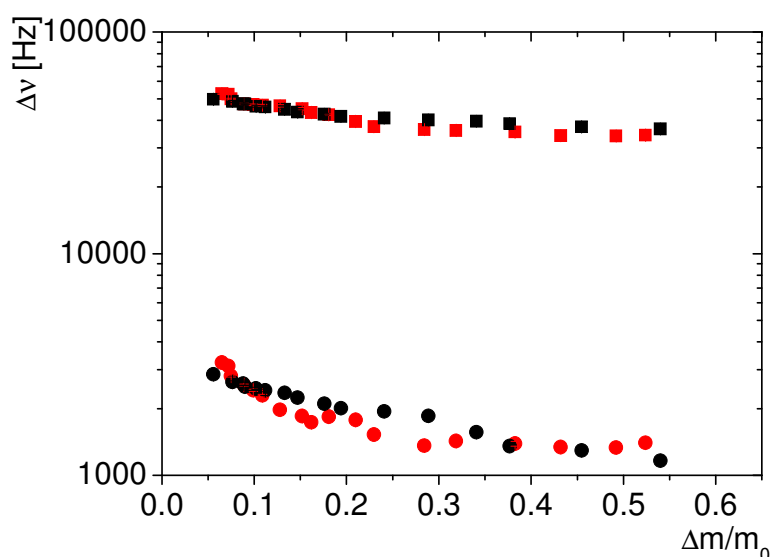
9.7 Spektroskopia ^1H -MRJ martwych plech *Cetraria aculeata*

Zarówno dla plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zebranych w dzień pochmurny jak i dzień słoneczny widma ^1H - MRJ dobrze dopasowane były złożeniem funkcji Gaussa oraz Lorentza, zgodnie z równaniem (9.12).

Niezależnie od protokołu doświadczalnego (plechy zebrane w dzień pochmurny, dzień słoneczny), szeroka linia ($\Delta\nu_G \approx 40$ kHz) pochodząca od zawartych w plesze badanych grzybów zlichenizowanych opisana jest funkcją Gaussa, której szerokość połówkowa nieznacznie maleje wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia. Podobne zachowanie zdradzają próbki plech żywych grzybów zlichenizowanych. Szerokość połówkowa linii Gaussa wskazuje na występowanie pól lokalnych o wartości rzędu 1 mT. Pole pod powierzchnią pików Gaussa użyto jako skalujący pole pod pikami opisanymi funkcją Lorentza.

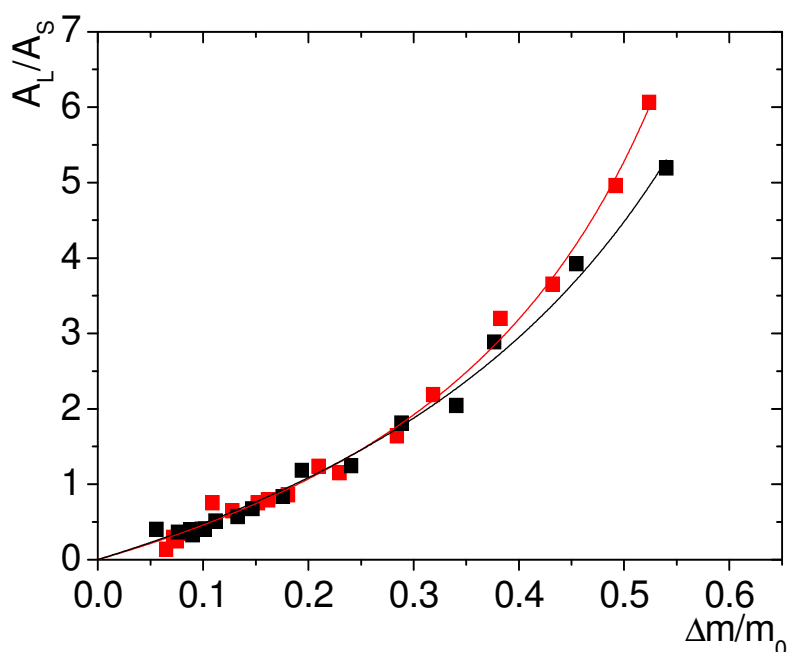
Podobnie jak dla żywych plech *Cetraria aculeata* wyodrębniono jedną składową cieczową, opisaną wąską linią Lorentza. Jej szerokość połówkowa zmienia się od około 3000 Hz dla niskich uwodnień do 1200 Hz dla uwodnień powyżej $\Delta m/m_0 = 0.5$. Hydratacyjne zależności szerokości połówkowych pików Lorentza wskazują, że dla niskich uwodnień piki pochodzą od protonów cieczowych ściśle związanych, a dla wyższych są uśrednionym sygnałem od protonów ściśle i luźno związanych (Rys. 9.21).

Dla plech zebranych w dzień pochmurny i w dzień słoneczny otrzymano podobne wartości szerokości połówkowych funkcji Gaussa i Lorentza opisujących widmo ^1H -MRJ, są one również zbliżone do wartości otrzymywanych dla komórek żywych grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*, co wskazuje, że proces zatrzymania czynności życiowych nie zmienił w istotny sposób na struktury plechy. Pozwala to na prowadzenie dalszej analizy zależności hydratacyjnych parametrów MRJ.



Rys. 9.21. Hydratacyjna zależność szerokości połówkowej krzywej Gaussa dla martwych plech *Cetraria aculeata* zebranych w dzień pochmurny (■) i dzień słoneczny (■) oraz krzywej Lorentza dla plech zebranych w dzień pochmurny (●) i dzień słoneczny (●).

Hydratacyjna zależność sygnału ^1H -MRJ w domenie częstości dla plech martwych jest nieliniowa (Rys. 9.22).



Rys. 9.22. Hydratacyjna zależność sygnału ciekowego ^1H -MRJ dla martwych plech *Cetraria aculeata* zebranych w dzień słoneczny (■) oraz pochmurny (■) wraz z dopasowaniami funkcji wymiennych postaci (9.1).

Dopasowanie do danych doświadczalnych prostych funkcji wymiennych postaci (9.13) pozwoliło ocenić ilość wody zapuławkowanej w plechach. Parametry dopasowania zależności (9.13) dla pomiarów w domenie częstości zostały zebrane w Tabeli 9.12.

Parametr dopasowania	Dzień słoneczny	Dzień pochmurny
A	4.09 ± 0.16	4.30 ± 0.21
B	0 ± 0.031	0 ± 0.026
C	-1.255 ± 0.034	-1.040 ± 0.051

Tabela 9.12. Współczynniki dopasowania prostych funkcji wymiennych do danych przedstawionych na Rys. 9.1.

Zarówno w plechach zebranych w dzień pochmurny jak i w dzień słoneczny nie stwierdzono obecności wody zapuławkowanej (współczynnik dopasowania B w granicach niepewności równy 0), wobec czego do zebranych danych zastosowano model opisany przez równanie (9.14). Otrzymane wyniki przedstawia Tabela 9.13.

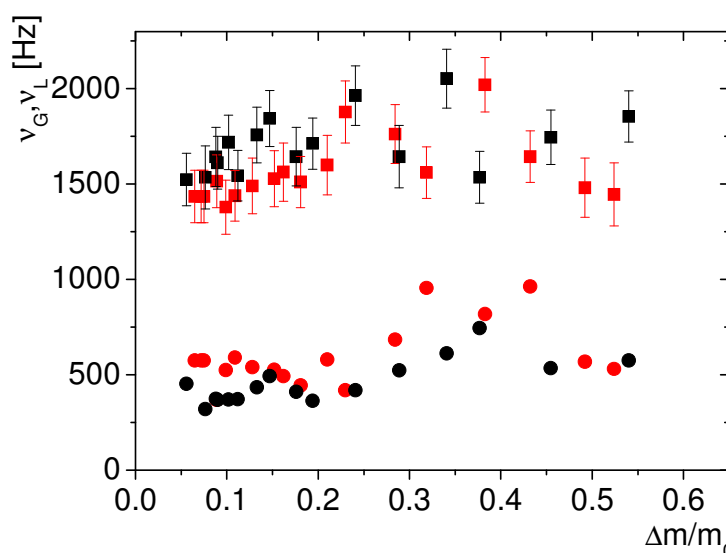
	Plechys zebrane w dzień słoneczny	Plechys zebrane w dzień pochmurny
c_s	0.84 ± 0.17	0.46 ± 0.12
δ	1.89 ± 0.43	1.52 ± 0.58
k	2.88 ± 0.87	2.8 ± 1.0

Tabela 9.13. Parametry dopasowania zależności (6.14) do hydratacyjnych zależności cieczowego sygnału ^1H -MRJ plech zebranych w dzień słoneczny i dzień pochmurny.

Plechys zebrane w dzień pochmurny oraz w dzień słoneczny w sposób zauważalny różnią się wyznaczonym stężeniem nasycenia substancji rozpuszczalnych.

MRJ dla protonów wody związanej zachodzi dla częstotliwości od 500 Hz do 1000 Hz większych od częstotliwości rezonansowej rezonansowej dla swobodnych protonów (300.14 MHz), przy czym nie stwierdza się wyraźnego rozróżnienia ze względu na plechy zebrane w dzień pochmurny i dzień słoneczny (Rys. 9.23).

Położenia centrów pików frakcji stałej są przesunięte o około 1000 Hz w stronę częstotliwości wyższych względem pików cieczowych. Większe niepewności związane z położeniem centrów pików gaussowskich związane są z trudniejszym ich precyzyjnym określeniem w miarę wzrostu puli wody związanej.



Rys. 9.23. Zależność położenia pików Gaussa (■ - dla plech zebranych w dzień słoneczny, ■ - dla plech zebranych w dzień pochmurny) oraz Lorentza (● - dla plech zebranych w dzień słoneczny, ● - dla plech zebranych w dzień pochmurny) od poziomu hydratacji martwych plech *Cetraria aculeata*.

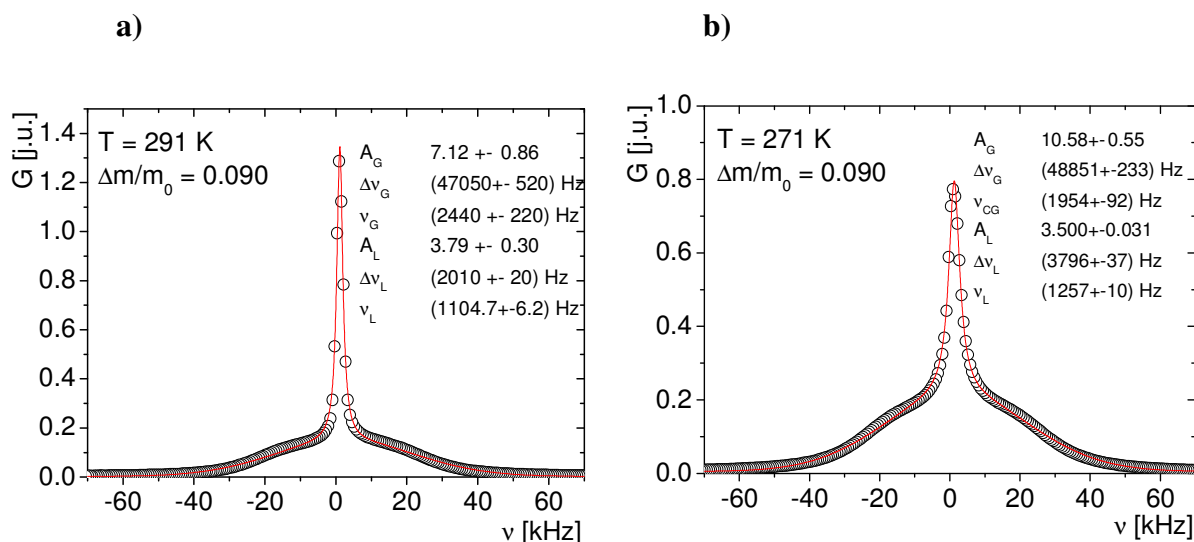
10. Pomiar temperatury plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

Pomiary zależności temperatury sygnału ^1H -MRJ dla plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wykonano w dziedzinie częstości (widma protonowe) i czasu (sygnały zaniku swobodnej precesji) podczas ochładzania plech od temperatury 24°C do temperatury -61°C . Wykonano także kilka pomiarów podczas ogrzewania plech od temperatury -61°C do 24°C celem sprawdzenia, czy występuje zjawisko histerezy temperaturowej.

10.1. Pomiar ^1H -NMR w dziedzinie częstości

Pomiary przeprowadzono dla plechy *Cetraria aculeata* o trzech różnych poziomach uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.090$, $\Delta m/m_0 = 0.343$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.482$. Wyodrębniono składową stałą widma opisaną funkcją Gaussa oraz jedną, uśrednioną składową cieczową opisaną funkcją Lorentza. Do zarejestrowanych widm dopasowano złożenie funkcji Gaussa i Lorentza zgodnie z formułą (9.12).

Rysunek 10.1 przedstawia przykłady widm zarejestrowanych dla próbki uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.090$ w różnych temperaturach.

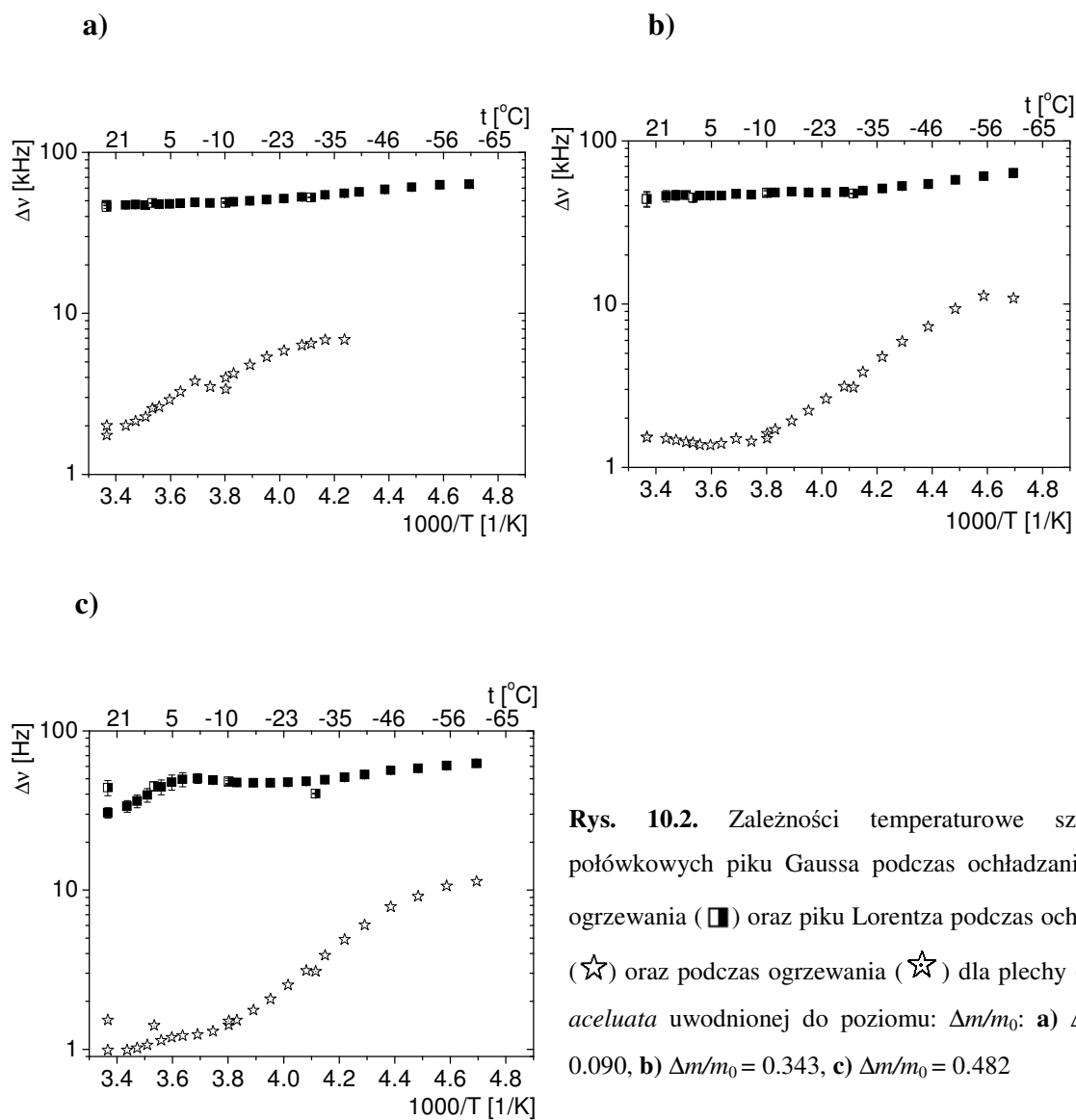


Rys. 10.1. Widma ^1H -MRJ dla odwodnionej plechy *Cetraria aculeata* ($\Delta m/m_0 = 0.090$) zarejestrowane w temperaturze: **a)** 291 K, **b)** 271 K.

10.1.1. Analiza sygnału pochodzącego od protonów frakcji stałej plechy *Cetraria aculeata*

Linia pochodząca od protonów frakcji stałej plechy *Cetraria aculeata* uwodnionej w zakresie od $\Delta m/m_0 = 0.09$ do $\Delta m/m_0 = 0.48$ jest w zadowalający sposób została opisana funkcją Gaussa o szerokości połówkowej około 50 kHz. Dla każdego z analizowanych uwodnień plechy szerokość linii rośnie o około 10% wraz z obniżaną temperaturą w zakresie od 24°C do -61°C. Odzwierciedla to unieruchomienie protonów matrycy stałej plechy i towarzyszący mu wzrost zakresu lokalnych pól magnetycznych. Dodatkowo wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia, linia od ciała stałego nieznacznie się zwęża (Rys. 10.2). Sugeruje to niewielki wzrost ruchliwości protonów ciała stałego wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. Jedynie dla największego poziomu hydratacji $\Delta m/m_0 = 0.482$ dla temperatur powyżej 5°C szerokość połówkowa linii Gaussa odbiega od pozostałych wyników, a mianowicie jest mniejsza niż 40 kHz, co prawdopodobnie spowodowane problemami numerycznymi z precyzyjnym wyodrębnieniem składowej stałej linii przesłanianej silnym sygnałem cieczowym. Szczegółowa analiza linii pochodzącej od ciała stałego ujawnia, że jest ona modyfikowana funkcją schodkową (*hat-like function*) [Derbyshire i in., 2004].

Ponieważ zmiany w ciele stałym wywoływane zarówno przez proces hydratacji, jak i zmianę temperatury nie są znaczne, pole powierzchni pod linią od ciała stałego, opisanym funkcją Gaussa zostało przyjęte za jednostkę, do której normalizowano sygnały cieczowe.



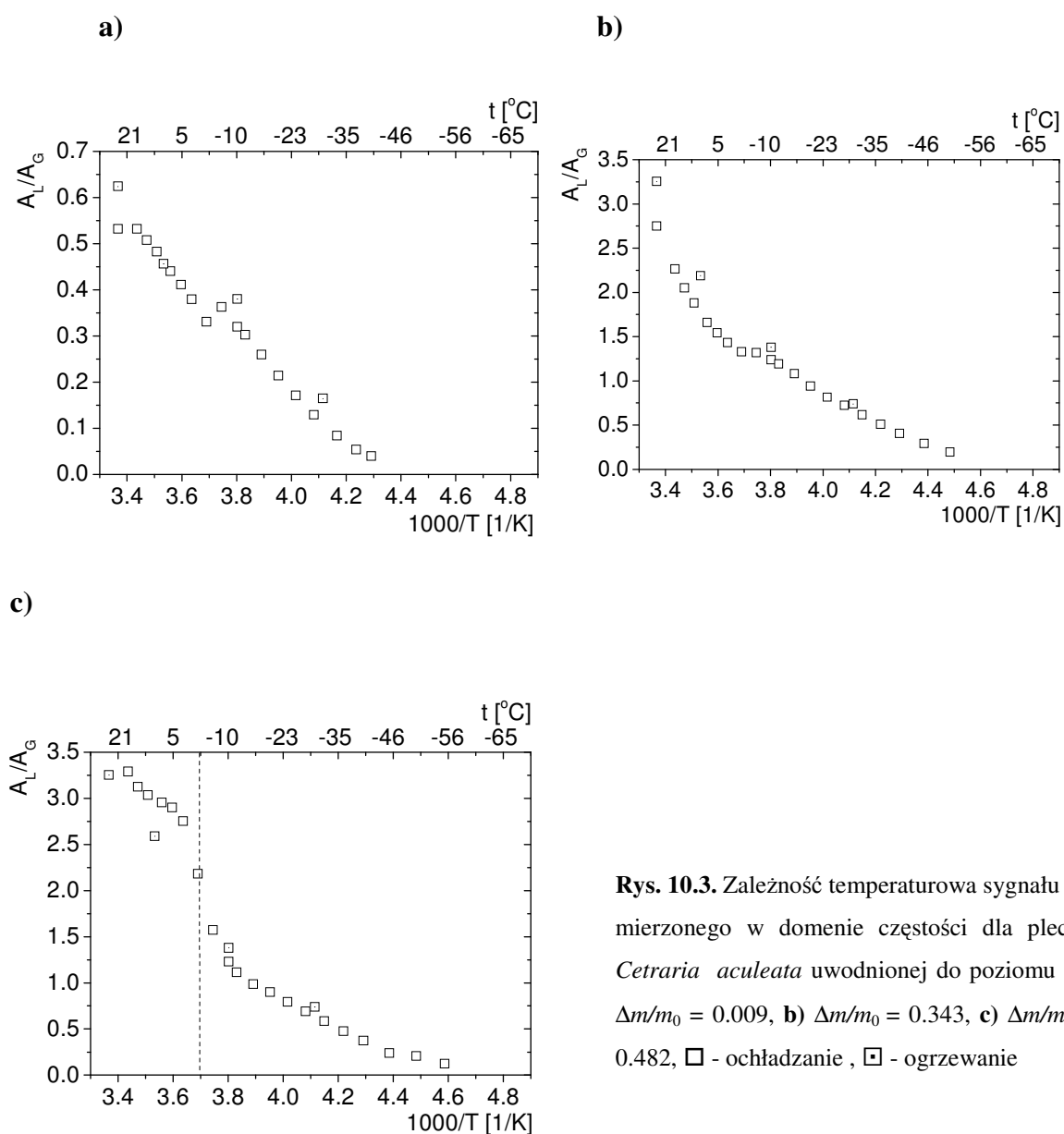
Rys. 10.2. Zależności temperaturowe szerokości połówkowych pików Gaussa podczas ochładzania (■) i ogrzewania (▣) oraz pików Lorentza podczas ochładzania (☆) oraz podczas ogrzewania (☆) dla plechy *Cetraria aceluata* uwodnionej do poziomu: $\Delta m/m_0$: a) $\Delta m/m_0 = 0.090$, b) $\Delta m/m_0 = 0.343$, c) $\Delta m/m_0 = 0.482$

10.1.2. Analiza sygnału pochodzącego od protonów wody związanej w plesze *Cetraria aculeata*

Dla wszystkich badanych próbek ($\Delta m/m_0 = 0.090$, 0.343 oraz 0.482) w całym zakresie temperatur od 24°C do -61°C wyodrębniono jedną, uśrednioną składową cieczową, którą opisuje funkcja Lorentza. Wraz z obniżaną temperaturą szerokość połówkowa linii rośnie od wartości około $1\text{--}2\text{ kHz}$ dla temperatury pokojowej do wartości 7 kHz dla najniższych temperatur. Szerokości połówkowe powyżej 7 kHz (obserwowane w najniższych temperaturach) prawdopodobnie odzwierciedlają skomplikowany kształt linii ciała stałego, pochodzącej od zestalonej wody, a nie sygnał od przechłodzonej cieczy.

Duża zmiana wartości szerokości połówkowej linii cieczowej wskazuje na proces stopniowego unieruchamiania protonów mobilnych wraz z obniżaną temperaturą.

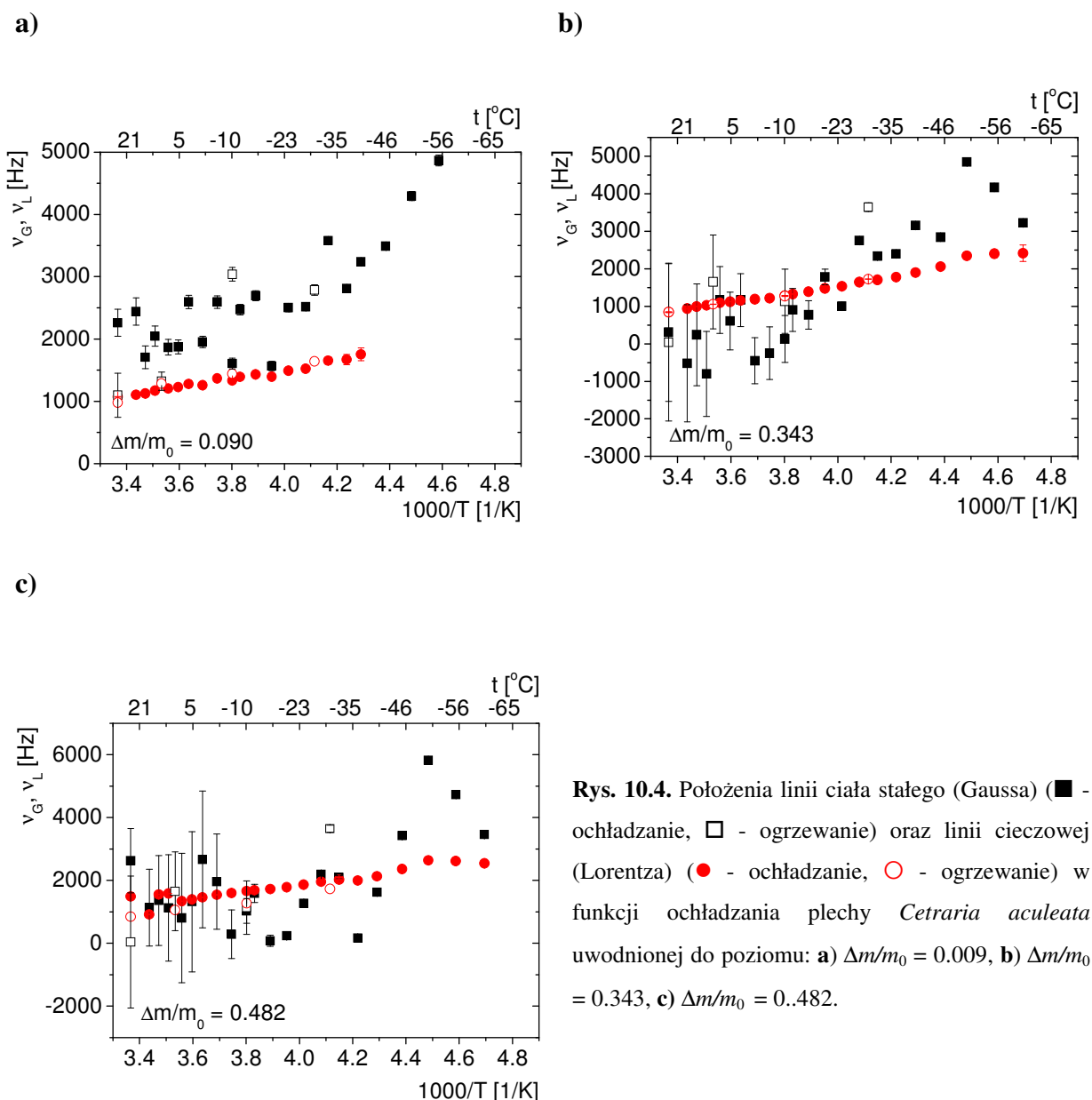
Stosunek pola powierzchni pod pikiem opisanym funkcją Lorentza do pola pod linią Gaussa, A_L/A_G , jest miarą liczby protonów we frakcji mobilnej. Dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.090$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.343$ obserwuje się ciągły spadek A_L/A_G w funkcji $1000/T$. Fakt ten, oraz zwiększanie się szerokości połówkowej linii cieczowej z obniżającą się temperaturą, świadczy o niekooperatywnym unieruchamianiu molekuł wody – bez formowania kryształu lodu Ih. Dla plechy o najwyższym uwodnieniu ($\Delta m/m_0 = 0.482$) spadek A_L/A_G w wąskim zakresie temperatur (od 2°C do -5°C) jest nagły i wynosi około 35% (co odpowiada ilości wody $\Delta m/m_0 = 0.032$) w stosunku do sygnału początkowego. Obserwowany skokowy spadek można przypisać kooperatywnemu unieruchomieniu protonów cieczowych, tworzenia kryształitu lodu. Brak skokowego zmniejszenia sygnału MRJ, A_L/A_G , w funkcji obniżanej temperatury dla próbek uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.090$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.343$ oraz taki jego spadek dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.482$ sugeruje istnienie ograniczeń mechanizmu ochraniającego grzyby zlichenizowany *Cetraria aculeata* przed zamarzaniem wody związanej w plesze. Mechanizm ten działa skutecznie jedynie do określonego poziomu uwodnienia.



Rys. 10.3. Zależność temperaturowa sygnału MRJ mierzonego w domenie częstości dla plechy *Cetraria aculeata* uwodnionej do poziomu **a)** $\Delta m/m_0 = 0.009$, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.343$, **c)** $\Delta m/m_0 = 0.482$, $\square$ - ochładzanie, $\square$ - ogrzewanie

10.1.3 Rozkład pól lokalnych w funkcji temperatury

Rys. 10.4 przedstawia położenie linii cieczonej oraz linii od ciała stałego dla plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* w funkcji obniżanej temperatury.



Rys. 10.4. Położenia linii ciała stałego (Gaussa) (■ - ochładzanie, □ - ogrzewanie) oraz linii cieczej (Lorentza) (● - ochładzanie, ○ - ogrzewanie) w funkcji ochładzania plechy *Cetraria aculeata* uwodnionej do poziomu: a) $\Delta m/m_0 = 0.009$, b) $\Delta m/m_0 = 0.343$, c) $\Delta m/m_0 = 0.482$.

Wraz z obniżaniem temperatury położenie linii Lorentza w plesze *Cetraria aculeata* przesuwa się w kierunku wyższych częstotliwości, od około 1000 Hz w temperaturze pokojowej (względem częstotliwości rezonansowej 300.14 MHz) do około 1700 Hz dla temperatury -61°C . Dla uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0.090$ położenia linii od ciała stałego także rosną wraz z obniżającą się temperaturą od wartości przesuniętych o około 1800 Hz od 300.14 MHz do około 5000 Hz (odpowiednio dla temperatury pokojowej i wynoszącej -61°C). Położenia pików pochodzących od protonów ciała stałego przesunięte są o około 1000 Hz w kierunku wyższych częstotliwości niż położenia linii od protonów wody związanej.

Dla próbki o hydratacji $\Delta m/m_0 = 0.482$ położenia pików Gaussa dla temperatur powyżej -10°C są obarczone dużą niepewnością, co związane jest z trudnością precyzyjnego

wyodrębnienia linii ciała stałego od linii ciekowej. Począwszy od temperatury -30°C w miarę jej zmniejszania położenia centrów pików Gaussa rosną od 0 do 5000 – 6000 Hz względem częstotliwości 300.14 MHz.

10.2. Pomiary plech *Cetraria aculeata* ^1H -MRJ w domenie czasu

Analiza pomiarów temperaturowych MRJ plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* w domenie częstości pozwala przypuszczać, że grzyb ten posiada mechanizm chroniący go przed tworzeniem krystalitów lodu wewnątrz plechy przy uwodnieniach poniżej pewnej wartości progowej (Rys. 10.3). Mechanizm ten może opierać się na wymianie (przetwarzaniu) puli wody luźno związanej na wodę ściśle związaną. Konieczna zatem staje się precyzyjna analiza frakcji ciekowej plech. Pomiary w domenie czasu wykonano na plechach uwodnionych do niskich poziomów hydratacji $\Delta m/m_0 = 0.039, 0.095, 0.137, 0.171, 0.199$ oraz dla dwóch wysokich $\Delta m/m_0 = 0.499, 0.964$. Do zebranych danych w zakresie temperatur od 24°C do -61°C :

- (i) dla niskich uwodnień ($\Delta m/m_0 = 0.039 - 0.171$) wyodrębniono dwie składowe wody związanej: ściśle- i luźno związaną a składowa stała FID była dobrze opisana funkcją Abragama w całym zakresie temperatur;

$$FID(t) = y_0 + Se^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} \frac{\sin at}{at} + L_1 e^{-\frac{t}{T_{2L1}^*}} + L_2 e^{-\frac{t}{T_{2L2}^*}}, \quad (10.1)$$

- (ii) dla uwodnień pośrednich ($\Delta m/m_0 = 0.199$ oraz 0.499) wyodrębniono jedną uśrednioną składową wody związanej relaksującą eksponencjalnie, a ciało stałe opisano przez Gaussa dla temperatur $t > -15.6^{\circ}\text{C}$ dla próbki uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.199$ oraz $t > -29.5^{\circ}\text{C}$ dla próbki uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.499$:

$$FID(t) = y_0 + Se^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} + Le^{-\frac{t}{T_{2L}^*}}, \quad (10.2)$$

a dla temperatur niższych funkcją Abragama:

$$FID(t) = y_0 + Se^{-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2} \frac{\sin at}{at} + Le^{-\frac{t}{T_{2L}^*}}, \quad (10.3)$$

- (iii) dla najwyższego poziomu uwodnienia ($\Delta m/m_0 = 0.964$) w całym zakresie temperatur wyodrębniono jedną składową ciekową, funkcja stała opisana funkcją

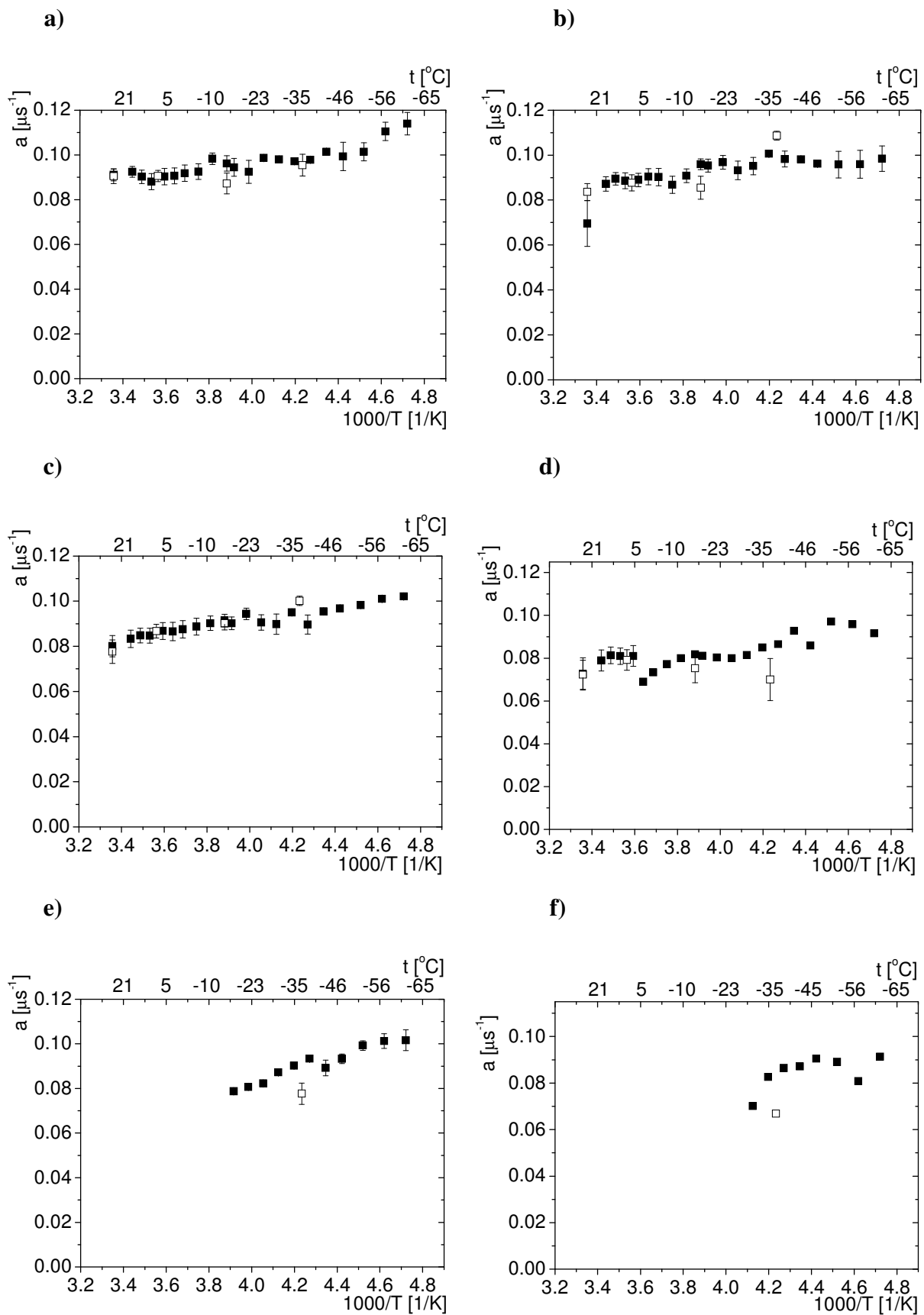
Gaussa [równanie (10.2)] Niemożność dopasowania funkcji Abragama spowodowana była prawdopodobnie względami numerycznymi (bardzo dużym udziałem składowej cieczowej sygnału).

10.2.1 Analiza składowej stałej sygnału zaniku swobodnej precesji

Składowa sygnału zaniku swobodnej precesji pochodząca od protonów ciała stałego dla plech nisko uwodnionych ($\Delta m/m_0 = 0.039 - 0.171$) w całym zakresie temperatur opisana była funkcją Abragama. Dla niższych temperatur charakterystyczna „falka” w sygnale FID była lepiej widoczna, co objawiało się wzrostem wartości parametru a funkcji Abragama i większą dokładnością jego wyznaczenia będącego miarą połowy szerokości połówkowej linii ciała stałego w domenie częstości.

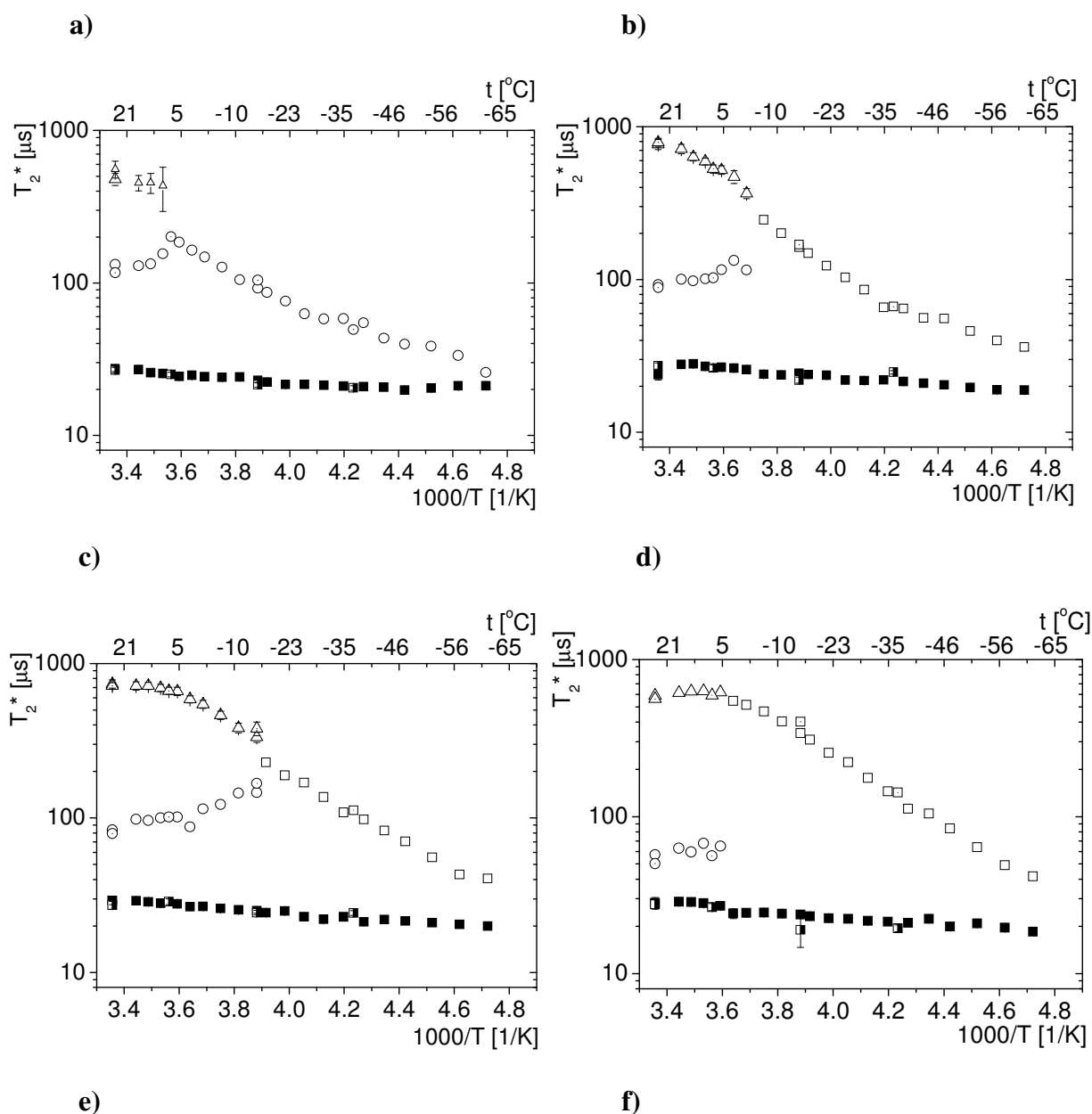
Próba dopasowania funkcji Abragama do składowych stałych funkcji FID zarejestrowanych dla plechy uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.199$ powyżej temperatury -15°C oraz dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.499$ powyżej temperatury -29.5°C dawała niespotykane w innych próbkach biologicznych wartości parametrów a (poniżej $0.07 \mu\text{s}^{-1}$, co odpowiadałoby szerokościom połówkowym linii ciała stałego poniżej 22 kHz). Składowa stała funkcji FID dla plech uwodnionych do poziomu 0.964 opisana była funkcją Gaussa w całym zakresie temperatur (od 24°C do -61°C). Temperaturowe zależności parametru a funkcji Abragama dla różnych poziomów hydratacji plech przedstawia Rys. 10.5.

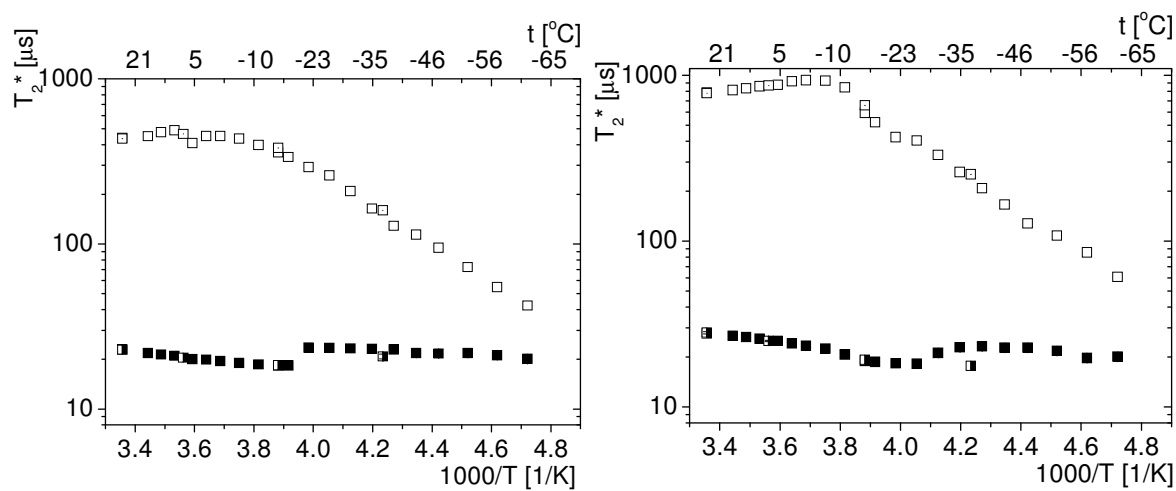
Dla plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wartość parametru a funkcji Abragama rośnie wraz ze spadkiem temperatury od około $0.08 \mu\text{s}^{-1}$ ($\Delta\nu = 25 \text{ kHz}$) do $0.12 \mu\text{s}^{-1}$ ($\Delta\nu = 38 \text{ kHz}$) dla plechy uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.039$ oraz $0.10 \mu\text{s}^{-1}$ ($\Delta\nu = 32 \text{ kHz}$) dla wyższych uwodnień. Niewielki wzrost parametru a , a więc poszerzenie linii ciała stałego wskazuje na nieznaczne unieruchamianie protonów matrycy stałej wraz z obniżającą się temperaturą.



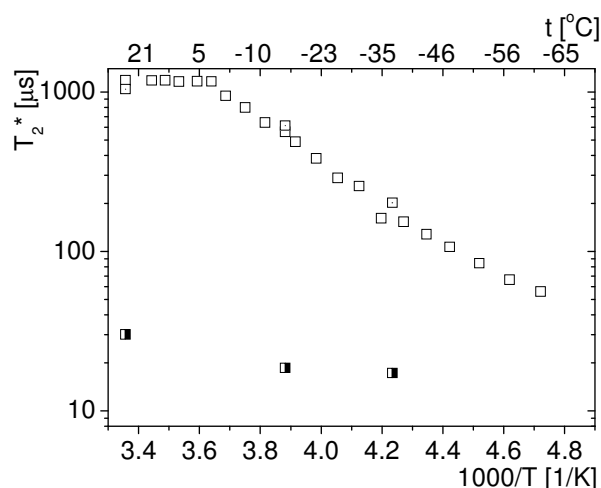
Rys. 10.5. Zależność parametru a funkcji Abragama w funkcji temperatury dla plech *Cetraria aculeata* uwodnionych do poziomu: **a)** $\Delta m/m_0 = 0.039$, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.095$, **c)** $\Delta m/m_0 = 0.137$, **d)** $\Delta m/m_0 = 0.171$, **e)** $\Delta m/m_0 = 0.199$ oraz **f)** $\Delta m/m_0 = 0.499$.

Czasy relaksacji składowej stałej sygnału FID (Rys. 10.6) nieznacznie maleją wraz z obniżającą się temperaturą (w wyniku unieruchamiania się protonów frakcji stałej plechy). Skokowy wzrost czasu relaksacji składowej stałej FID dla plechy uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.199$ spowodowany jest czynnikami numerycznymi spowodowanymi zmianą modelu opisującego składową stałą sygnału (model Gaussa dla wyższych temperatur niż -15.6°C) i model Abragama dla niższych).





g)



Rys. 10.6. Zależność temperaturowa czasów relaksacji spinowo-spinowej dla składowej stałej i cieczonej sygnału FID dla plech *Cetraria aculeata* uwodnionych do poziomu: **a)** $\Delta m/m_0 = 0.039$, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.095$, **c)** $\Delta m/m_0 = 0.137$, **d)** $\Delta m/m_0 = 0.171$, **e)** $\Delta m/m_0 = 0.199$, **f)** $\Delta m/m_0 = 0.499$ oraz **g)** $\Delta m/m_0 = 0.964$.

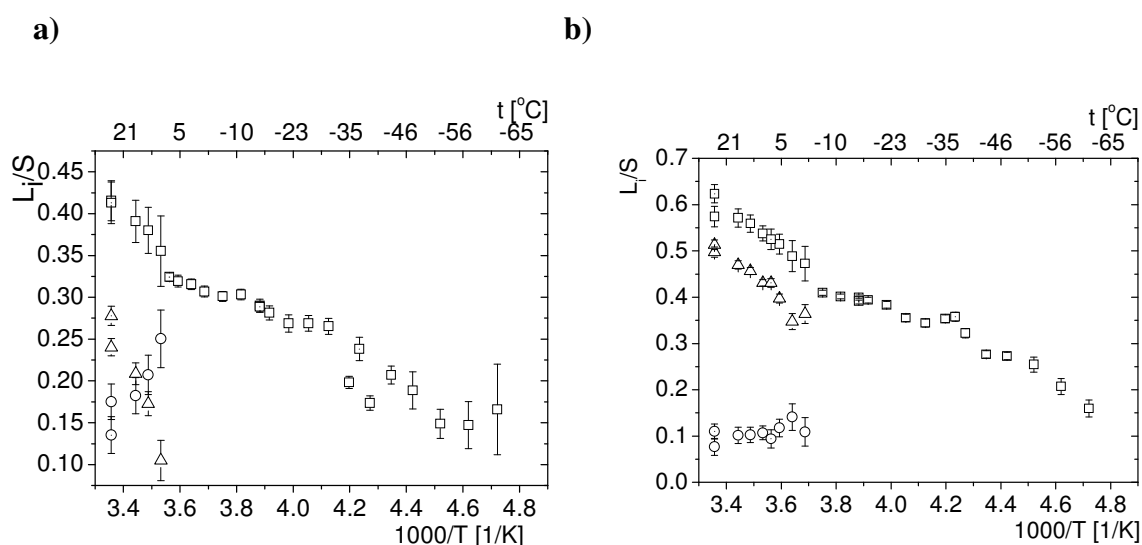
10.2.2 Temperaturowa zależność składowej cieczonej sygnału FID

W dehydratowanych plechach *Cetraria aculeata* ($\Delta m/m_0 = 0.039 - 0.171$) wyodrębniono dwa podukłady wody związanej różniące się czasami relaksacji spinowo-spinowej – $T_{2L1}^* \approx 100 \mu s$ dla wody ściśle związanej oraz kilkaset mikrosekund dla wody luźno związanej, przy czym w próbce uwodnionej do $\Delta m/m_0 = 0.039$ rozdzielania na te podukłady dokonano w całym zakresie temperatur, natomiast w plechach uwodnionych w zakresie $\Delta m/m_0 = 0.095 - 0.171$ jedynie dla wyższych temperatur (zależnych od uwodnienia próbek). Dla niższych temperatur rejestrowano jedną, uśrednioną składową cieczonej, której czas

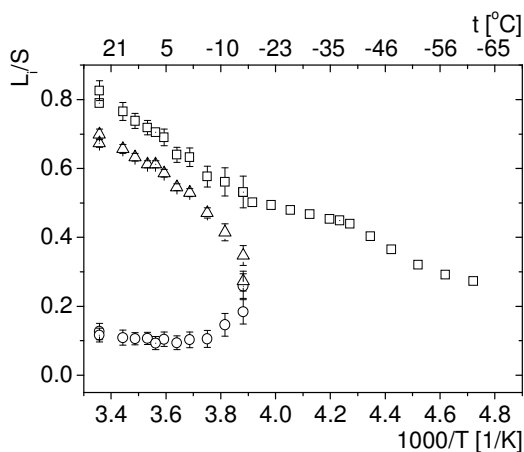
relaksacji malał od wartości kilkuset mikrosekund do około 50-60 μs dla niskich temperatur (Rys. 10.6).

Dla plech uwodnionych w zakresie $\Delta m/m_0 = 0.199 - 0.964$ wyodrębniono jedną, uśrednioną składową wody związanej, dla której czas relaksacji T_{2L}^* dla wyższych temperatur był stały, a następnie malał wraz z obniżającą się temperaturą. Skracanie wartości czasów relaksacji dla uśrednionej składowej cieczowej sugeruje stopniowe unieruchamianie protonów cieczowych wraz z obniżaniem temperatury plech.

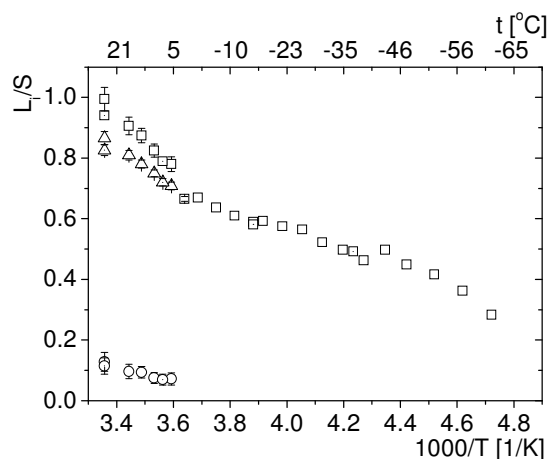
Rys. 10.7 przedstawia zależność amplitud sygnałów cieczowych L_1 (woda ściśle związana) i L_2 (woda luźno związana) oraz sumarycznego sygnału cieczowego L wyrażonych w jednostkach amplitudy ciała stałego od temperatury. Sumaryczny sygnał L/S dla próbek uwodnionych poniżej $\Delta m/m_0 = 0.499$ maleje w sposób ciągły, co sugeruje, że protony unieruchamiają się niekooperatywnie – w plechach nie dochodzi do tworzenia kryształów lodu. Ponadto analiza sygnałów pochodzących od protonów wody ściśle związanej L_1/S oraz protonów wody luźno związanej L_2/S wskazuje, że następuje wymiana między tymi pulami wody, co jest szczególnie dobrze widoczne dla najsuchszej z próbek ($\Delta m/m_0 = 0.039$) oraz uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.137$ (rys. 10.7a, c). Pula wody luźno związanej maleje kosztem pojawiania się puli niezamarzającej wody ściśle związanej. Podobny mechanizm odporności na zamarzanie zaobserwowano u innych antarktycznych grzybów zlichenizowanych: *Umbilicaria aprina* [Harańczyk i in., 2012b] oraz *Cladonia mitis* [Harańczyk, 2003].



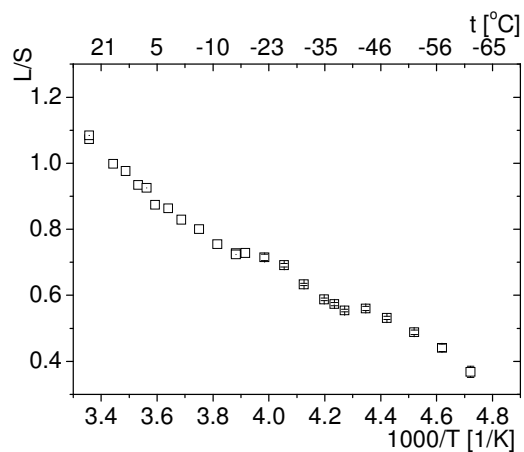
c)



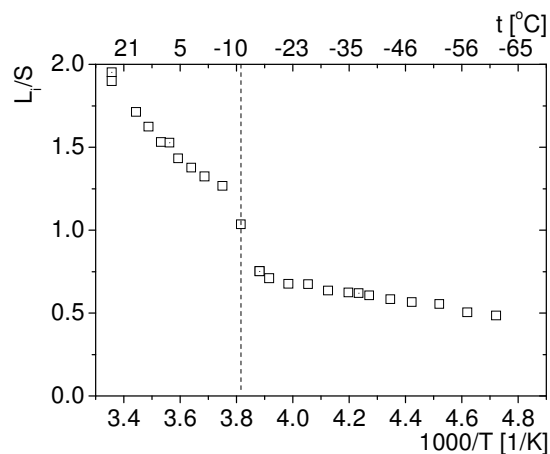
d)



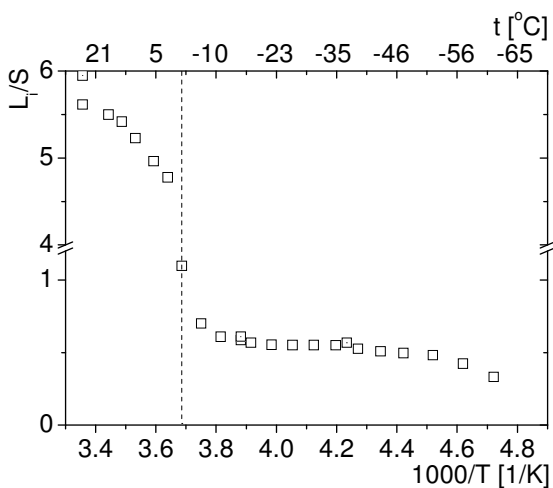
e)



f)



g)



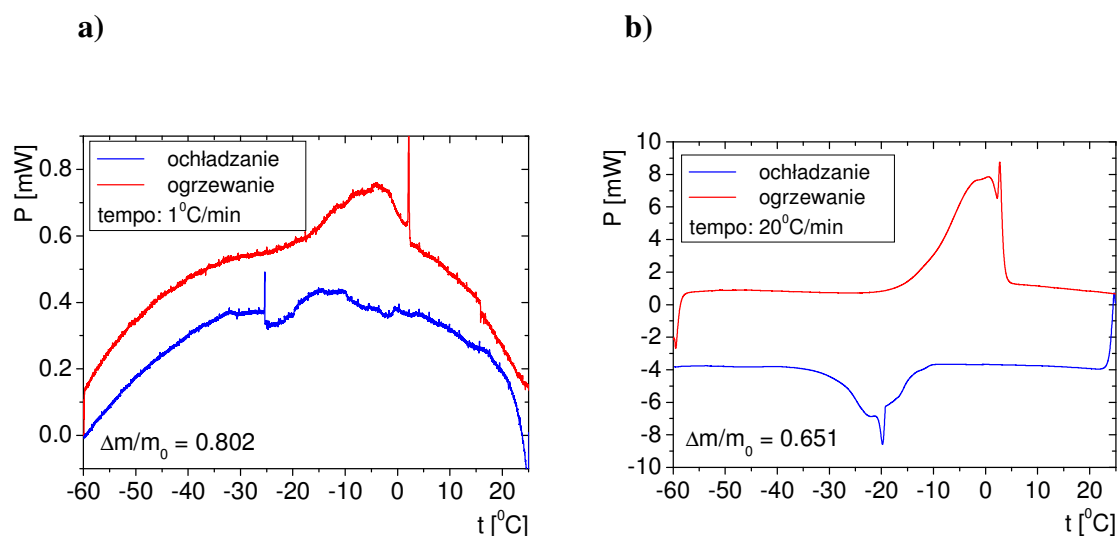
Rys. 10.7. Zależność temperaturowa amplitud obu składowych cieczowych sygnału FID oraz sumarycznej składowej cieczowej wyrażonej w jednostkach amplitudy sygnału ciała stałego dla plechy *Cetraria aculeata* uwodnionej do poziomu: **a)** $\Delta m/m_0 = 0.039$, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.095$, **c)** $\Delta m/m_0 = 0.137$, **d)** $\Delta m/m_0 = 0.171$, **e)** $\Delta m/m_0 = 0.199$, **f)** $\Delta m/m_0 = 0.499$ oraz **g)** $\Delta m/m_0 = 0.964$. Linia przerywaną zaznaczono temperaturę kooperatywnego unieruchamiania molekuł wody.

11. Pomiary kalorymetryczne plech *Cetraria aculeata*

Celem potwierdzenia zaobserwowanych w pomiarach MRJ przejść fazowych (kooperatywnego zamarzania wody) w plechach grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wykonano pomiary kalorymetryczne. Pomiary te przeprowadzono dla plech uwodnionych w zakresie $\Delta m/m_0 = 0.121 - 0.802$. Dla plech uwodnionych poniżej $\Delta m/m_0 = 0.36$ nie zaobserwowano przejść fazowych. Dla wszystkich próbek uwodnionych powyżej tego poziomu zaobserwowano przejścia fazowe podczas ogrzewania (topnienie). Zamarzanie obserwowano w próbkach uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 \geq 0.556$. Dla plechy uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.071$ wykonano pomiar w kierunku obserwacji ewentualnego przejścia szklanego.

11.1. Szybkość zmian temperatury

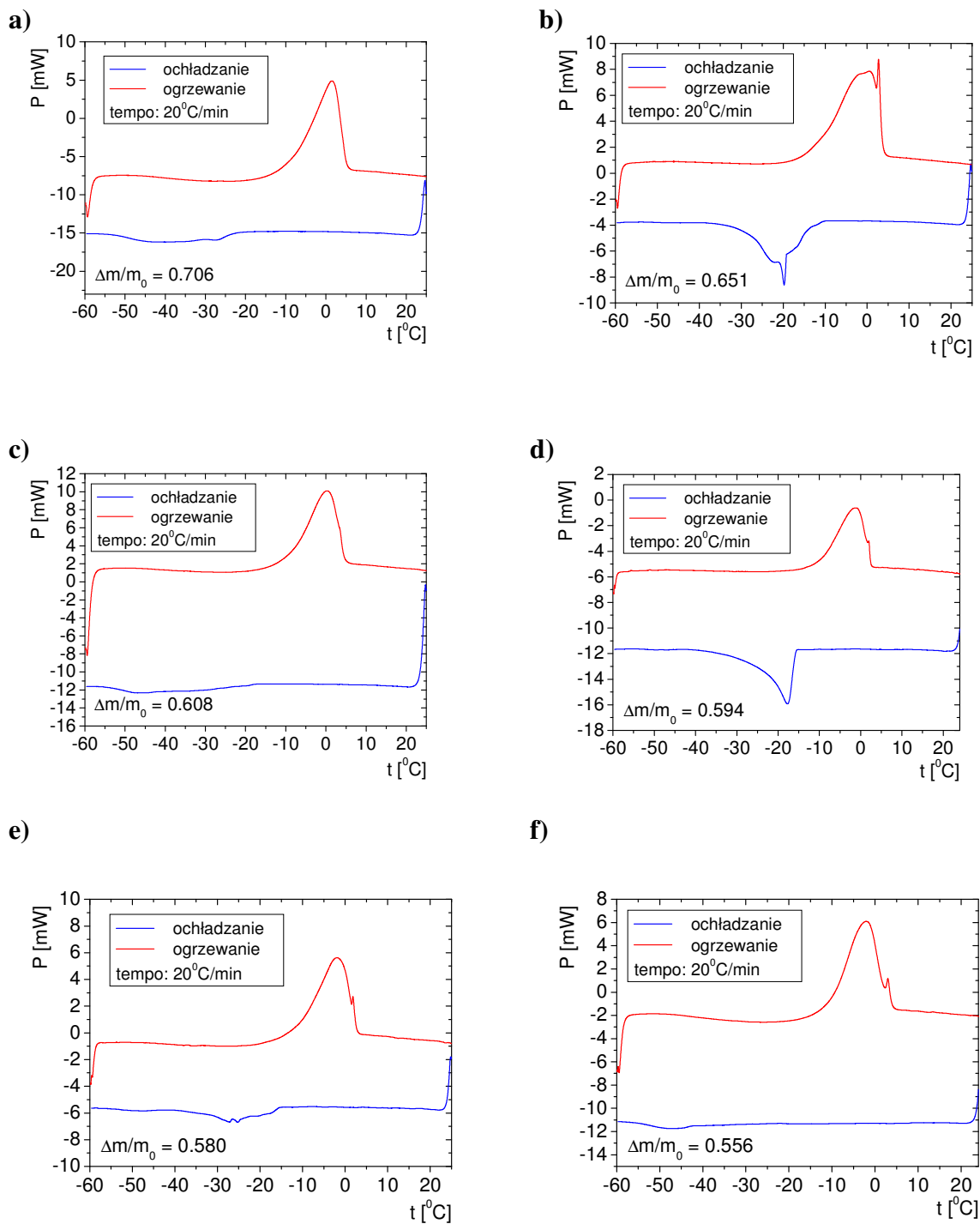
Dla określenia odpowiedniej szybkości zmian temperatury wykonano pomiary dla szybkości chłodzenia/grzania $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ oraz $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dla dwóch próbek o wysokich uwodnieniach. Próbkę uwodnioną do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.802$ ochładzano/ogrzewano w tempie $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, natomiast uwodnioną do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.651$ w tempie $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Mała szybkość zmian temperatury spowodowała trudność z ustaleniem poziomu linii bazowej oraz większe rozmycie pików (Rys. 11.1). Z kolei temperatury *onsetu* zanotowane podczas grzania wynosiły około -15°C dla próbki ogrzewanej z szybkością $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ oraz -11°C dla próbki ogrzewanej z szybkością $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, co - uwzględniając różnice w poziomie uwodnienia oraz kłopotem z precyzyjnym określeniem linii bazowej przy powolnych pomiarach - nie jest dużym rozrzutem. Stwierdzono, że zmiana szybkości chłodzenia/ogrzewania nie ma znaczącego wpływu na przemiany fazowe zachodzące w badanej plechzie. Podobnie zachowanie zaobserwowano u grzyba zlichenizowanego *Umbilicaria aprina* [Harańczyk i in., 2012b].

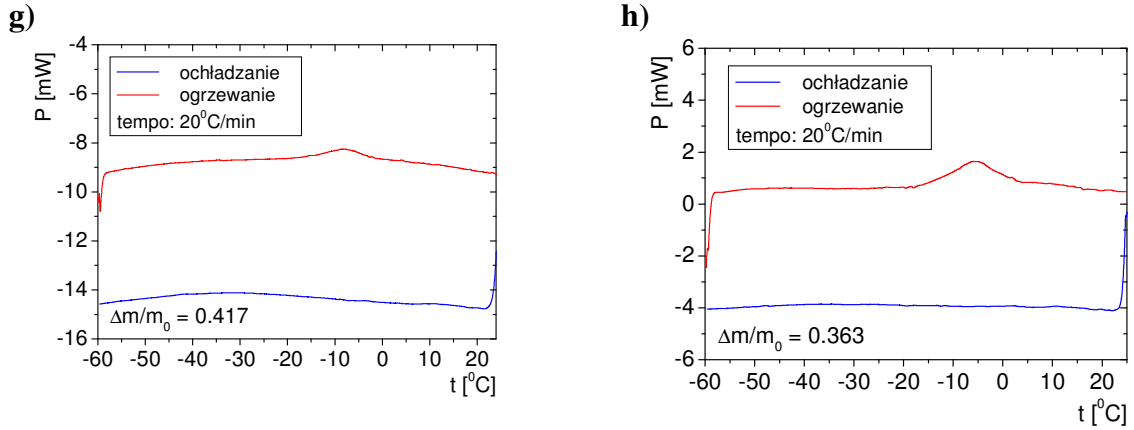


Rys. 11.1. Pomiar kalorymetryczny uwodnionej plechy *Cetraria aculeata* – wybór tempa zmian temperatury. Zależność mocy oddanej podczas ochładzania (krzywa niebieska) oraz pobranej podczas ogrzewania (krzywa czerwona) od temperatury dla tempa zmian temperatury wynoszącego: **a)** 1°C/min (uwodnienie próbki $\Delta m/m_0 = 0.802$), **b)** 20°C/min (uwodnienie próbki $\Delta m/m_0 = 0.651$).

11.2. Zamarzanie i topnienie wody związanej w plesze grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*

Dla plech uwodnionych do poziomu poniżej $\Delta m/m_0 = 0.363$ nie zaobserwowano pików świadczących ani o zamarzaniu wody ani o topnieniu lodu. Dla plech uwodnionych powyżej $\Delta m/m_0 = 0.363$ stwierdza się piki kalorymetryczne przy ogrzewaniu natomiast dla plech uwodnionych powyżej $\Delta m/m_0 = 0.556$ obecność pików świadczących o zamarzaniu. Piki pochodzące od zamarzającej wody miały większą szerokość oraz były trudniejsze do wyodrębnienia z linii bazowej. Zależności hydratacyjne krzywych DSC przedstawiono na Rysunku 11.2.





Rys. 11.2 a)-h) Krzywe kalorymetryczne próbek plech *Cetraria aculeata* uwodnionych do różnych poziomów. Poziom uwodnienia próbek podano na każdym z rysunków. Krzywa niebieska została zarejestrowana podczas ogrzewania chłodzenia plech, a krzywa czerwona – podczas ogrzewania.

11.3. Hydratacyjna zależność temperatury zamarzania i topnienia wody związanej w plesze *Cetraria aculeata*

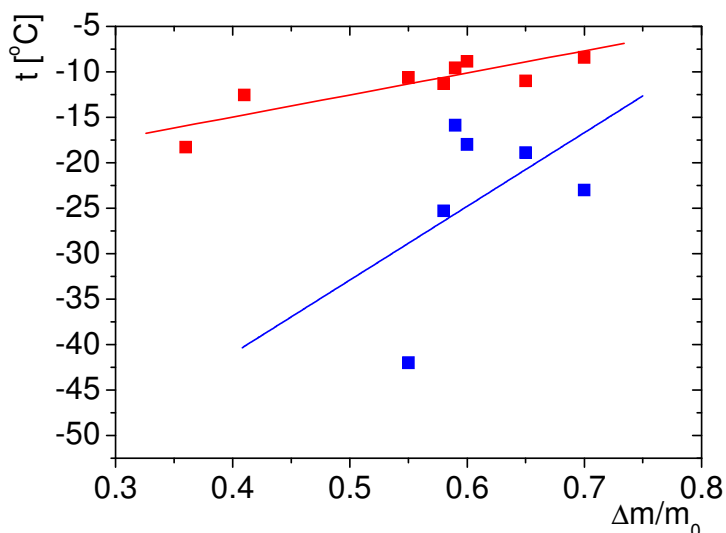
Temperatura (temperatura *onsetu* zarejestrowanego piku) zamarzania i topnienia zależy od poziomu uwodnienia (Rys. 11.3). Zależność temperatury topnienia od poziomu uwodnienia plechy można przybliżyć funkcją liniową:

$$t_{ogr} = (24.2 \pm 5.3)^{\circ}\text{C} \cdot \frac{\Delta m}{m_0} - (24.7 \pm 3.0)^{\circ}\text{C} ; \quad (11.1)$$

gdzie t_{ogr} jest zarejestrowaną temperaturą topnienia.

Podobnie zależność temperatury zamarzania plechy, t_{chl} , od jej poziomu uwodnienia może zostać przedstawiona:

$$t_{chl} = (81 \pm 78)^{\circ}\text{C} \cdot \frac{\Delta m}{m_0} - (73 \pm 48)^{\circ}\text{C} \quad (11.2)$$



Rys. 11.3. Temperatury zamarzania (■) oraz topnienia (■) zarejestrowane podczas chłodzenia/ogrzewania plech *Cetraria aculeata* w zależności od poziomu uwodnienia plech.

Duże niepewności obliczonych współczynników dopasowania w równaniu (11.2) są wynikiem trudności w określeniu położenia pików krzywej DSC podczas ochładzania próbki.

Temperatura zamarzania oraz topnienia wody związanej w plesze *Cetraria aculeata* rośnie wraz poziomem uwodnienia plech, bowiem wraz ze zwiększającą się masą wody, rośnie jej objętość w kawernach plechy, a więc i liczba jąder nukleacji heterogennej lodu.

11.4. Hydratacyjna zależność zmiany entalpii

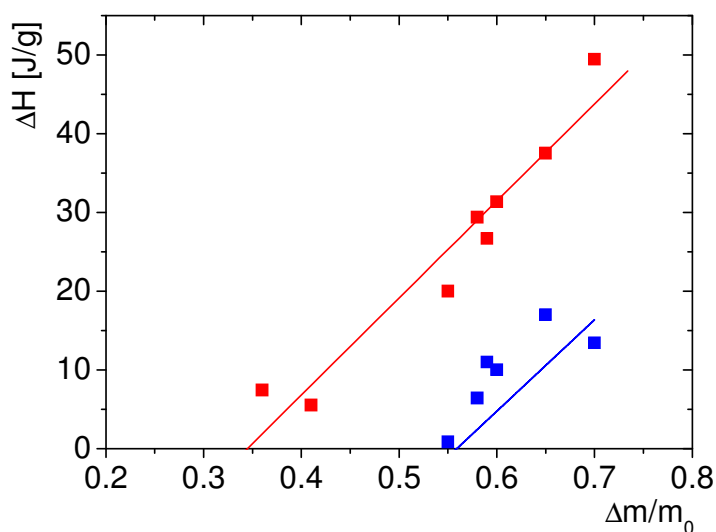
Zmiana sumarycznej entalpii przejścia fazowego w funkcji uwodnienia jest miarą masy wody podlegającej topnieniu lub zamarzaniu. Zależność zmiany entalpii przejścia fazowego od uwodnienia plechy (Rys. 11.4) może zostać opisana funkcją liniową.

Dla ogrzewania plechy:

$$\Delta H_{ogrz} = [(123 \pm 14) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} - (42.5 \pm 8.0)] \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}; \quad (11.3)$$

Dla ochładzania plechy:

$$\Delta H_{chl} = [(116 \pm 73) \cdot \frac{\Delta m}{m_0} - (65.0 \pm 4.6)] \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}. \quad (11.4)$$



Rys. 11.4. Zmiana entalpii przejścia podczas ochładzania (■) oraz ogrzewania (■) uwodnionej *Cetraria aculeata* w zależności od poziomu uwodnienia plech.

Graniczne wartości uwodnień plech, dla których stwierdza się obecność przejścia fazowego [miejsca zerowe krzywych opisanych równaniami (11.3) oraz (11.4)] wynoszą odpowiednio: dla zamarzania $(\Delta m/m_0)_{gr} = 0.56$ oraz $(\Delta m/m_0)_{gr} = 0.35$ dla topnienia.

11.5. Przejście szkliste

W układach biologicznych zawierających wielocukry i wieloalkohole dla niskich poziomów uwodnień obserwuje się przejścia fazowe II rodzaju (przejścia szkliste). Przykładem jest tu larwa ochotki *Polypedilum vanderplanki* [Watanabe i in., 2003]. Celem zbadania, czy w plechach grzybów zlicheniowanych *Cetraria aculeata* występuje takie przejście wykonano pomiar kalorymetryczny dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.071$. Szybkość zmian temperatury wynosiła 40°C/min.

Nie zaobserwowano przejścia szklistego.

12. Spektroskopia relaksacyjna i transfer magnetyzacji

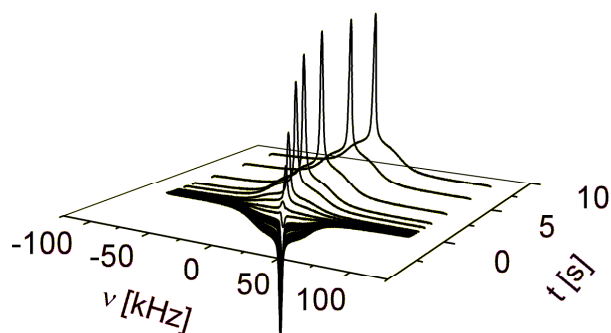
Spektroskopia relaksacyjna (*inversion recovery*) jest metodą, która pozwala wyznaczyć czas relaksacji podłużnej T_1 z osobna dla każdej linii widma ^1H -MRJ (domena częstości) lub zaników swobodnej precesji (domena czasu) po sekwencji dwuimpulsowej. Prowadząc pomiary w domenie częstości, czas T_1 wyznacza się na podstawie szybkości odrostu widma w zależności od odstępu między impulsami π i $\pi/2$.

Jeśli pierwszy z impulsów będzie bardzo długim impulsem o niskiej mocy (*impuls miękki, soft pulse*), wówczas zadziała jedynie na momenty magnetyczne związane z protonami cieczowymi. Podanie kolejnego impulsu o wysokiej mocy (*impuls twardy, hard pulse*) spowoduje obrót wszystkich spinów. Jeśli mimo to wystąpią zmiany w powierzchni pod pikiem Gaussa w zależności od odstępu czasu między impulsami, oznacza to, że występuje transfer magnetyzacji - przepływ między protonami frakcji stałej próbki a cieczowymi. Jest to miara występujących oddziaływań między tymi frakcjami.

12.1. Spektroskopia relaksacyjna

Pomiary czasu relaksacji podłużnej żywych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wykonano dla trzech poziomów uwodnień: $\Delta m/m_0 = 0.092$, $\Delta m/m_0 = 0.194$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.603$. Impuls $\pi/2$ miał długość 2.1 μs , natomiast impuls π trwał 4.2 μs . Oba impulsy miały moc 400 W. Czas między impulsami zmieniano w zakresie od $\tau = 5$ ms do $\tau = 8.5$ s.

Rysunek 12.1 przedstawia zestawienie otrzymanych widm dla plechy o najmniejszej badanej hydratacji.



Rys. 12.1. Złożenie widm plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* uzyskanych po sekwencji dwóch impulsów twardych: π oraz $\pi/2$ w zależności od czasu między impulsami.

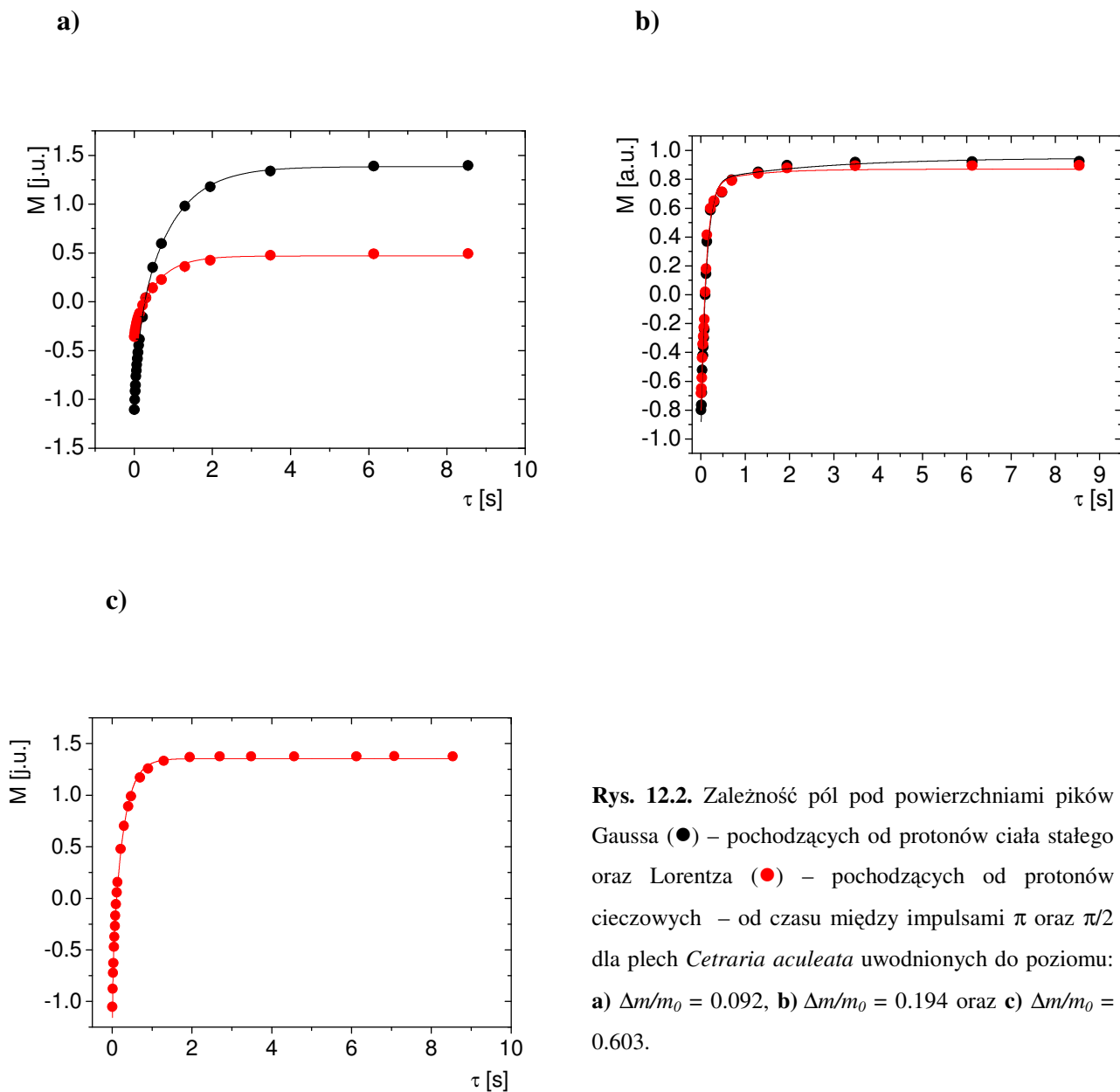
Dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.092$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.194$ do zarejestrowanych widm dopasowano superpozycję funkcji Gaussa i Lorentza (równanie (9.12)). Szerokości połówkowe funkcji Gaussa wynosiły około 47 kHz, natomiast funkcji Lorentza około 1200 Hz. Dla plechy uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.603$ z powodów numerycznych nie udało się wyodrębnić sygnału pochodzącego od frakcji stałej – do widm dopasowano jedynie funkcję Lorentza o szerokościach połówkowych rzędu 1300 Hz.

Rysunek 12.2 przedstawia wyniki pomiarów spektroskopii relaksacyjnej – zależności pól pod krzywą Gaussa i Lorentza od czasu między impulsami - dla wszystkich zmierzonych uwodnień plech.

Zarówno w przypadku magnetyzacji pochodzącej od protonów ciała stałego jak i protonów wody, odrost magnetyzacji jest procesem dwueksponencjalnym, stąd do otrzymanych danych dopasowano funkcję:

$$M(\tau) = M_1(1 - 2e^{-\tau/T_{1(1)}}) + M_2(1 - 2e^{-\tau/T_{1(2)}}). \quad (12.1)$$

gdzie M_1 i M_2 są amplitudami pierwszej i drugiej składowej sumujących się do początkowej wartości magnetyzacji, a $T_{1(1)}$ i $T_{1(2)}$ ich czasami relaksacji.



Rys. 12.2. Zależność pól pod powierzchniami pików Gaussa (●) – pochodzących od protonów ciała stałego oraz Lorentza (●) – pochodzących od protonów ciekowych – od czasu między impulsami π oraz $\pi/2$ dla plech *Cetraria aculeata* uwodnionych do poziomu: **a)** $\Delta m/m_0 = 0.092$, **b)** $\Delta m/m_0 = 0.194$ oraz **c)** $\Delta m/m_0 = 0.603$.

Odrost magnetyzacji pochodzącej od protonów ciała stałego próbki uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.092$ scharakteryzowany jest czasami relaksacji podłużnej wynoszącymi $T_{1(1)} = (23.4 \pm 4.7)$ ms oraz $T_{1(2)} = (635 \pm 34)$ ms. Czas relaksacji spinowo-sieciowej dla poszczególnych składowych wynosi: $T_{1(1)} = (9.2 \pm 2.6)$ ms, a także $T_{1(2)} = (565 \pm 32)$ ms. Relaksacja protonów plechy uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.194$ scharakteryzowana jest przez czasy $T_{1(1)} = (124 \pm 11)$ ms oraz $T_{1(2)} = (2.7 \pm 1.2)$ s dla ciała stałego i $T_{1(1)} = (118 \pm 15)$ ms oraz $T_{1(2)} = (1.02 \pm 0.73)$ s dla protonów ciekowych.

Plecha uwodniona do najwyższego poziomu ($\Delta m/m_0 = 0.603$) charakteryzuje się czasem relaksacji związanym z relaksacją protonów cieczowych wynoszącym $T_{1(2)} = (17.5 \pm 2.5)$ ms oraz $T_{1(2)} = (259 \pm 10)$ ms. Tabela 12.1 przedstawia zebrane parametry dopasowań.

		$\Delta m/m_0 = 0.092$	$\Delta m/m_0 = 0.194$	$\Delta m/m_0 = 0.603$
Składowa stała	M_1 [j.u.]	0.259 ± 0.024	0.869 ± 0.044	
	$T_{1(1)}$ [s]	0.0234 ± 0.0047	0.124 ± 0.011	
	M_2 [j.u.]	1.06 ± 0.23	0.0801 ± 0.0043	
	$T_{1(2)}$ [s]	0.635 ± 0.034	2.7 ± 1.2	
Składowa cieczowa	M_1 [j.u.]	0.0871 ± 0.0082	0.816 ± 0.086	0.314 ± 0.022
	$T_{1(1)}$ [s]	0.0095 ± 0.0027	0.118 ± 0.015	0.0175 ± 0.0025
	M_2 [j.u.]	0.3824 ± 0.0070	0.0536 ± 0.0085	1.040 ± 0.021
	$T_{1(2)}$ [s]	0.565 ± 0.033	1.02 ± 0.73	0.259 ± 0.010

Tabela 12.1. Parametry dopasowania odrostu składowej stałej i cieczowej magnetyzacji dla trzech badanych próbek.

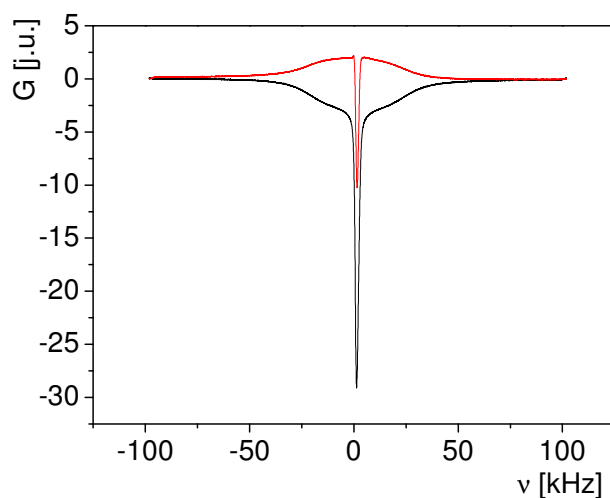
W plesze *Cetraria aculeata* uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.092$, zarówno sygnał pochodzący od protonów ciała stałego jak i od wody jest sumą dwóch składowych. Dla próbki o wyższym uwodnieniu ($\Delta m/m_0 = 0.194$) czasy relaksacji poprzecznej dla wszystkich składowych są dłuższe. Jednak wyznaczone są z większymi niepewnościami. Znaczne wydłużenie czasów relaksacji $T_{1(2)}$ długie składowych odrostu (M_2) wskazuje na problemy numeryczne z dopasowaniem krzywej do ostatnich punktów odrostu. Natomiast krótkie składowe M_1 są najprawdopodobniej uśrednieniem dwóch składowych widocznych w plechach suchych ($\Delta m/m_0 = 0.092$).

Dla próbki uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.603$, gdy w sygnale zaobserwowano jedynie wkład od protonów cieczowych, dwueksponencyjny odrost magnetyzacji ponownie jest dobrze określony (stosunkowo niewielkie niepewności pomiarowe i podobny udział

procentowy amplitud poszczególnych składowych jak w przypadku najmniej uwodnionej plechy).

12.2. Transfer magnetyzacji

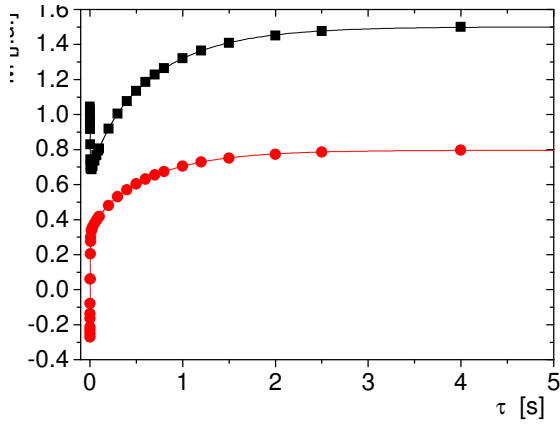
Powietrznie suchą plechę *Cetraria aculeata* ($\Delta m/m_0 = 0.102$) poddano działaniu sekwencji dwuimpulsowej (*soft – hard*), $\pi - \tau - \pi/2$, z tym że pierwszy impuls, bardzo długi, impuls miał obniżoną moc, natomiast detekcyjny impuls $\pi/2$ był zwykłej mocy. Następnie obserwowano zmiany pól pod krzywymi Gaussa i Lorentza w funkcji zmienianego czasu τ . Odzwierciedlają one zmiany magnetyzacji w próbce. Następnie podano standardową sekwencję *hard – hard* i obserwowano odrost magnetyzacji analogicznie jak w pomiarach spektroskopii relaksacyjnej. Rysunek 12.3 przedstawia widma zarejestrowane po sekwencji impulsów *hard – hard* oraz *soft – hard*.



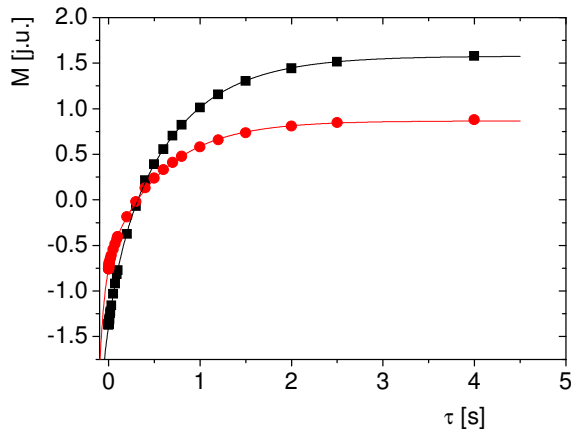
Rys. 12.3. Widmo ^1H -MRJ plechy *Cetraria aculeata* poddanych sekwencji impulsów $\pi - 0.2 \text{ ms} - \pi/2$. Linia czarna – oba impulsy twarde (*hard – hard*), linia czerwona – pierwszy impuls miękki, drugi twardy (*soft – hard*).

Pole $\vec{B}_1$ wytworzone przez impuls miękki nie przekracza wartości pól lokalnych w ciele stałym, dlatego obraca on niemal wyłącznie spiny cieczowe. Tylko w niewielkim stopniu wpływa na spiny protonów ciała stałego. Zmiany pól pod powierzchniami krzywych Gaussa (sygnał pochodzący od protonów ciała stałego) oraz Lorentza (sygnał pochodzący od protonów cieczowych) zostały przedstawione na Rysunku 12.4. Dla

porównani przedstawiono także zmiany pól pod powierzchniami tych krzywych po sekwencji impulsów *hard – hard* (Rys. 12.5).



Rys. 12.4. Pola powierzchni pod krzywymi Gaussa (■) oraz Lorentza (●) dla plech *Cetraria aculeata* poddanych sekwencji impulsowej *soft-hard*.



Rys. 12.5. Pola powierzchni pod krzywymi Gaussa (■) oraz Lorentza (●) dla plech *Cetraria aculeata* poddanych sekwencji impulsowej *hard-hard*.

Do zebranych danych po podaniu sekwencji impulsów *soft-hard* dopasowano złożenie funkcji trójeksponencjalnej:

$$M(\tau) = M_0 + M_1 e^{-\tau/T_a} - M_2 e^{-\tau/T_b} - M_3 e^{-\tau/T_c}, \quad (12.2)$$

gdzie M_0 jest całkowitym poziomem magnetyzacji, M_1 , M_2 , M_3 – amplitudami wyodrębnionych składowych, a T_a , T_b i T_c charakteryzują ich czas zaniku/odrostu. Aby móc porównać otrzymane parametry z parametrami charakteryzującymi odrost magnetyzacji po sekwencji impulsów *hard-hard* do danych przedstawionych na Rysunku 12.5 dopasowano funkcję dwueksponencjalną:

$$M(\tau) = M_0 - M_2 e^{-\tau/T_B} - M_3 e^{-\tau/T_C} . \quad (12.3)$$

Tabela 12.2 przedstawia parametry dopasowania krzywych przedstawionych na rysunkach 12.4 i 12.5.

		sekwencja <i>soft-hard</i>	sekwencja <i>hard-hard</i>
Część stała	M_0 [j.u.]	1.5007±0.0026	1.5770±0.0066
	M_I [j.u.]	0.4109±0.0024	-
	T_a [s]	0.003190±0.000056	-
	M_2 [j.u.]	0.137±0.021	0.492±0.037
	T_b [s]	0.176±0.024	0.1305±0.0091
	M_3 [j.u.]	0.708±0.021	2.456±0.034
	T_c [s]	0.730±0.021	0.679±0.012
Część cieczowa	M_0 [j.u.]	0.796±0.036	0.8662±0.0066
	M_I [j.u.]	-(0.6285±0.0041)	-
	T_a [s]	0.003341±0.000062	-
	M_2 [j.u.]	0.068±0.020	0.1553±0.0018
	T_b [s]	0.124±0.042	0.0535±0.0098
	M_3 [j.u.]	0.404±0.019	1.460±0.017
	T_c [s]	0.671±0.039	0.604±0.013

Tabela 12.2. Parametry dopasowania funkcji relaksacji w eksperymencie transferu magnetyzacji dla plech *Cetraria aculeata*. Parametry dopasowano równaniami (12.2) oraz (12.3) do danych doświadczalnych przedstawionych na rysunku 12.5.

Dla danych zebranych po sekwencji *soft – hard* zarówno w sygnale stałym (ubytek sygnału) jak i cieczowym (wzrost sygnału) obecna jest bardzo krótka składowa (oznaczona indeksami „1” oraz „a”). Opisuje ona proces transferu magnetyzacji między fazą stałą a fazą cieczową próbki. Charakterystyczny czas opisujący to zjawisko wynosi $T_a \approx 3$ ms, co jest wartością znacznie dłuższą niż czasy relaksacji spinowo – spinowej wyznaczone w pomiarach MRJ w domenie czasu. stąd zjawisko transferu magnetyzacji nie wpływało znacząco na wyniki pomiarów ^1H -MRJ

Należy zwrócić uwagę, że występuje także niewielki odrost magnetyzacji związanej z protonami frakcji stałej po podaniu sekwencji *soft-hard* (Rys. 12.5), co dowodzi, że impuls miękki w niewielkim stopniu działa także na spiny frakcji stałej.

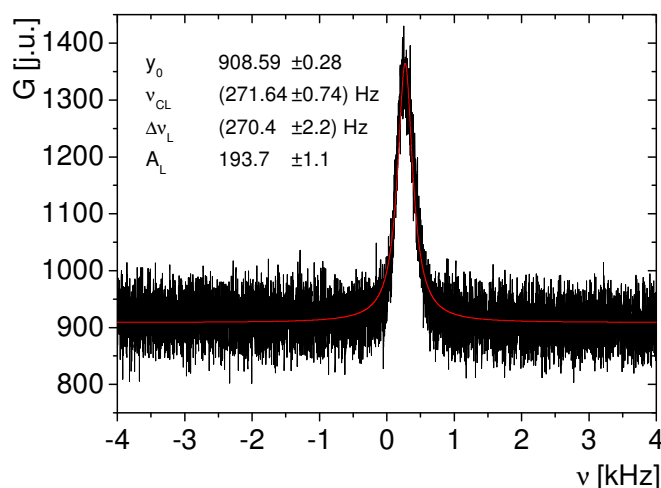
13. Pomiary ^2D -MRJ, ^{13}C -MRJ, ^{31}P -MRJ w domenie częstości

Dla powietrznie suchej, żywej plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zarejestrowano widma ^2D -, ^{13}C - oraz ^{31}P -MRJ. Deuter, obok protu, jest naturalnie występującym, stabilnym izotopem wodoru (abundancja 0.015%), węgiel obecny jest we wszystkich organizmach żywych, gdyż jest podstawą budowy związków organicznych, a fosfor jest kluczowym składnikiem cząsteczek energetycznych ATP/ADP oraz błon biologicznych. Dla oszacowania szerokości połówkowych otrzymanych pików w widmach deuteronomym i węglowym, zastosowano funkcję Lorentza postaci:

$$G(\nu) = y_0 + \frac{2A_L}{\pi} \cdot \frac{\Delta\nu_L}{4(\nu - \nu_{LC})^2 + \Delta\nu_L^2} \quad (13.1)$$

13.1. Widma ^2D -MRJ

Do zarejestrowania widma deuterowego użyto impulsu $\pi/2$ o mocy 100 W oraz długości 1.5 μs . Zarejestrowane widmo, powstałe z uśrednienia 40 akwizycji przedstawia Rysunek 13.1.

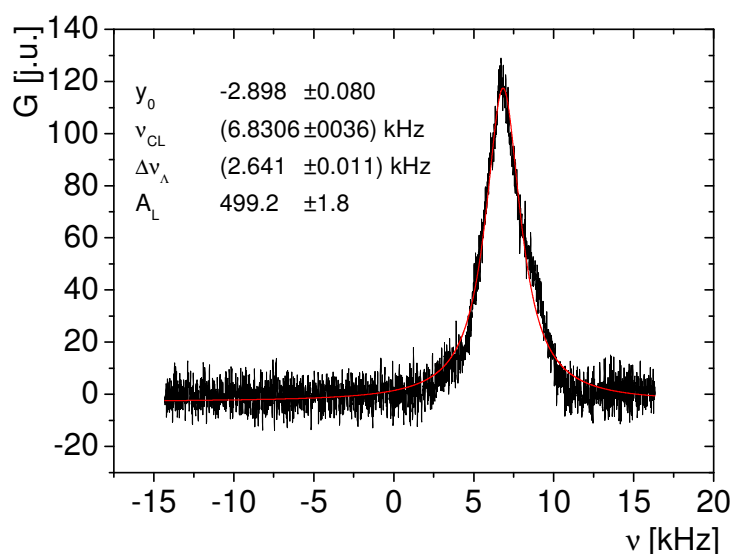


Rys. 13.1. Widmo ^2D -MRJ plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*.

Położenie „0” na osi odciętych odpowiada częstotliwości rezonansowej swobodnych jąder deuteru w polu magnetycznym o wartości indukcji $B_0 = 7 \text{ T}$ wynoszącej 46.07 MHz. Szerokość połówkowa zarejestrowanego piku wynosi $(270.4 \pm 2.2) \text{ Hz}$, a położenie jego centrum $(271.64 \pm 0.74) \text{ Hz}$. Rezonans jąder ^2D związanych w próbce przesunięty jest w kierunku wyższych częstotliwości względem jąder swobodnych.

13.2. Widma ^{13}C -MRJ

Węgiel jest szeroko rozpowszechnionym pierwiastkiem w organizmach żywych. Abundancja izotopu ^{13}C wynosi około 1.1%. Jej niska wartość pozwala na uniknięcie konieczności odsprężania homojądrowego podczas rejestracji widm.. Zarejestrowane widmo ^{13}C -MRJ plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* zostało przedstawione na Rysunku 14.2. Widmo zarejestrowano po podaniu impulsu $\pi/2$ o czasie trwania 1 ms i mocy 100 W.



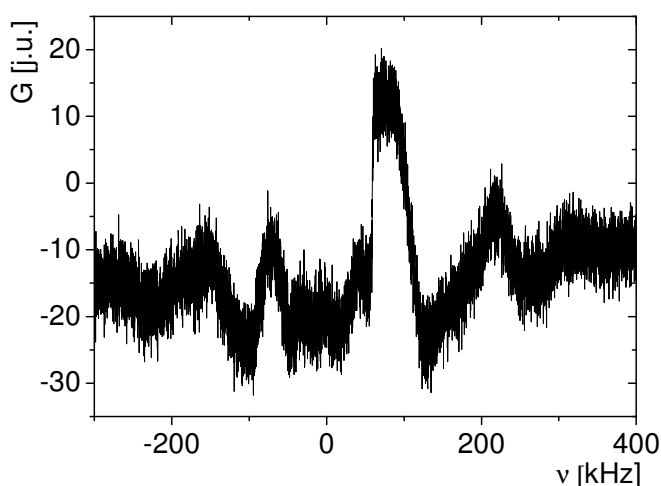
Rys. 13.2. Widmo ^{13}C -MRJ plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*.

Szerokość połówkowa piku Lorentza dopasowanego do zarejestrowanego widma wynosi $(2.641 \pm 0.011) \text{ kHz}$. Rezonans jąder izotopu węgla ^{13}C związanych w plechach grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* przesunięty jest ku wyższym częstotliwościom niż rezonans w jądrach swobodnych (75.47 MHz) - położenie środka piku wynosi $(6.8306 \pm 0.0036) \text{ kHz}$ względem częstotliwości rezonansowej. Poszerzenie linii widma pochodzi od sprzężeń heterojądrowych proton-węgiel ^{13}C , bowiem eksperyment przeprowadzono bez odsprężania protonów

13.3. Widmo ^{31}P -MRJ

Rysunek 13.3. przedstawia widmo ^{31}P -MRJ zarejestrowane po podaniu impulsu $\pi/2$ o mocy 50 W trwającego $3 \mu\text{s}$. Mimo zebrania 10000 akwizycji, stosunek sygnału do szumu jest niewielki, wskazuje to na niewielką ilość ^{31}P obecną w próbce. Może on pochodzić od fosforu nieorganicznego, P_i , ATP, fosfokreatyny (wąskie linie), oraz od fosfolipidów obecnych w niewielkiej proporcji w błonach fotosyntetycznych fotobionta plechy (bardzo szeroka linia od fazy lamellarnej lub fazy heksagonalnej ciekłego kryształu liotropowego).

Zarejestrowane widmo ^{31}P -MRJ jest złożone, składa się z kilku szerokich pików o szerokościach połówkowych kilkudziesięciu kiloherców, znacząco poszerzonych sprzężeniem skalarnym heterojądrowym z otaczającymi atom fosforu protonami. Położone są w zakresie między -200 kHz, a 300 kHz względem częstotliwości rezonansowej dla swobodnych jąder ^{31}P (121.44 MHz w polu magnetycznym o wartości indukcji $B_0 = 7\text{T}$). Centrum pików, pod którym pole powierzchni jest największe znajduje się w położeniu około 70 kHz.



Rys. 13.3. Widmo ^{31}P -MRJ plechy grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*.

W zarejestrowanym widmie nie udało się wyodrębnić charakterystycznych linii fosforu nieorganicznego, linii występujących w widmach ATP/ADP, w fosfokreatynie, ponieważ poszerzenie linii było bardzo znaczne.

V. DYSKUSJA

Badania morfologiczne wykonane metodami skaningowej mikroskopii elektronowej oraz mikrotomografii komputerowej pokazały, że wewnętrzna struktura plech *Cetraria aculeata* jest wyraźnie podzielona na warstwę korową i rdzeniową, jednak komórki fotobionta obecne są w całej przestrzeni warstwy środkowej, a nie tylko w pobliżu kory. Warstwa korowa jest porowata, co umożliwia przenikanie cząsteczek wody do wnętrza plechy. W warstwie rdzeniowej obecne są pustacie, które mogą stanowić nawet 30-40% objętości plechy. Istnieją drobne różnice w morfologii plechy zależnie od wykonania miejsca przekroju. Ustalono, że najwięcej komórek fotobionta znajduje się w części podstawnej plechy, najwięcej obszarów pustych znajduje się w okolicy odgałęzień plechy

Pomiary fluorymetryczne aktywności fotosyntetycznej plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wykazały, nie zależy ona od poziomu ich uwodnienia. Nie zmienia się nawet wtedy, gdy plechy były uwadniane z fazy ciekłej. Aktywność fotosyntetyczna plech *Cetraria aculeata* jest niewielka w porównaniu do roślin, z uwagi na to, że komórki fotobiontyczne znajdują się pod warstwą korową, stąd dostęp światła jest do nich utrudniony. Jednakże takie usytuowanie chroni komórki fotobionta przed zbyt intensywnym promieniowaniem świetlnym mogącym je uszkodzić.

Pomiary żywotności komórek fotobionta zawartych w plesze grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* wykazały, że zarówno wysokie uwodnienie plech jak i ich mrożenie (a w szczególności kombinacja tych czynników) negatywnie wpływa na przeżywalność komórek fotosyntetyzujących. Żywotność komórek fotobionta jest malejącą funkcją uwodnienia plech. Wysoki poziom uwodnienia niekorzystnie wpływa na przeżywalność obniżając ją o ponad 40% w stosunku do przeżywalności plech suchych.

Komórki fotobionta w próbkach plech mrożonych wykazują znacznie mniejszą przeżywalność niż w plechach, które nie były mrożone. Odsetek komórek żywych spada wraz o około 70%. Drastyczny spadek przeżywalności obserwowany dla uwodnień większych niż $\Delta m/m_0 = 0.5$ związany jest z występowaniem kooperatywnego unieruchamiania molekuł wody (krystalizacja lodu).

Żywe plechy grzybów zlichenizowanych *Cetraria aculeata* charakteryzowały się trójkspონencjalną kinetyką hydratacji. Wielokspონencjalne kinetyki hydratacji plech obserwuje się dla krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych, które z uwagi na swoją budowę bardziej narażone są na działanie niekorzystnych czynników atmosferycznych niż plechy innych typów. Dwukspონencjalna kinetyka hydratacji obserwowana była grzybów zlichenizowanych *Ramalina terebrata* [Harańczyk i in., 2012c], *Leptogium puberulum* [Harańczyk i in., 2009b], *Usnea antarctica* [Harańczyk i in., 2006b]. Jendnokspონencjalne kinetyki hydratacji charakteryzują grzyby listkowate plechy grzybów zlichenizowanych takich jak: *Umbilicaria decussata* [Harańczyk i in., 2008], czy *Umbilicaria antarctica* [Harańczyk, 2003]. Podział ten nie jest regułą, bowiem w listkowatej plesze *Umbilicaria aprina* obserwowano dwukspონencjalne kinetyki hydratacji [Harańczyk, 2003; Harańczyk i in., 2008]. Podobne przebiegi kinetyk hydratacji obserwowano także dla innych próbek biologicznych. Jednokspონencjalne kinetyki hydratacji charakteryzują ziarna pszenicy [Harańczyk, 2003] oraz liofilizaty ich błon fotosyntetycznych [Harańczyk i in., 2009c] oraz liofilizaty modeli błon DGDG [Harańczyk i in., 2009a]. Dwukspონencjalne kinetyki hydratacji obserwowane były dla skrobi ziemniaczanej [Witek, 2006], a trójkspონencjalne z procesem pęcznienia w wilgotności względnej $h = 1$ dla liofilizatów DNA pochodzącej ze spermy łososia [Harańczyk i in., 2010].

Izoterma sorpcyjna opisująca zależność nasyceniowego poziomu uwodnienia plechy *Cetraria aculeata* od wilgotności względnej tak jak w przypadku innych, badanych grzybów zlichenizowanych [Harańczyk, 2003], a także wielu innych układów biologicznych, ma postać sigmoidalną i jest dobrze opisana przez model Denta. Ilość wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące w plesze *Cetraria aculeata* ($\Delta M/m_0 = 0.0457 \pm 0.0032$) jest nieco mniejsza niż dla innych grzybów zlichenizowanych (tabela 6.5), a także mniejsza od charakteryzującej liofilizaty DNA ($\Delta M/m_0 = 0.114$) czy skrobi ziemniaczaną ($\Delta M/m_0 = 0.086$) [Witek, 2006]. Hydrofobowość powierzchni plechy *Cetraria aculeata* ($1/b_1 = 0.9\%$) jest podobna do hydrofobowości innych, badanych gatunków porostów, jednak mniejsza niż dla DNA spermy łososia ($1/b_1 = 2.95\%$) [Harańczyk i in., 2010], a większa niż dla skrobi ziemniaczanej ($1/b_1 = 0.1\%$) [Witek, 2006]. Ilość wody nasycająca pierwotne miejsca wiążące odpowiada ilości wody bardzo mocno związanej, nieusuwalnej nad powierzchnią żelu krzemionkowego.

Sygnały zaniku swobodnej precesji pozwoliły na wyodrębnienie trzech pól protonów ze względu na ich ruchliwość: (i) budujących matrycę stałą (o średnim czasie relaksacji $T_{2S}^* \approx 25 \mu s$), (ii) należących do puli wody ściśle związanej wiążącej się bezpośrednio do matrycy

stałej ($T_{2L1}^* \approx 120 \mu s$) oraz (iii) należących do puli wody luźno związanej ($T_{2L2}^* \approx 560 \mu s$). Sygnał pochodzący od protonów ciała stałego dla niskich uwodnień został opisany funkcją Abragama ($a \approx 0.10 \mu s^{-1}$) lub – dla wysokich uwodnień, gdzie sygnał pochodzący od protonów cieczowych dawał duży wkład – funkcją Gaussa. „Przysłanianie” złożonego sygnału frakcji stałej przez mocny sygnał cieczowy jest charakterystyczne dla innych gatunków grzybów zlichenizowanych oraz wielu pozostałych układów biologicznych. Sygnał pochodzący od wody ściśle związanej w plesze *Cetraria aculeata* ulega wysyceniu na poziomie $(L_1/S)_{max} = 0.150 \pm 0.013$ dla $\Delta m/m_0 = 0.072$. Wartość ta jest zbliżona do wartości sumy ilości wody silnie związanej nieusuwalnej nad powierzchnią żelu krzemionkowego oraz frakcji wody silnie związanej wysycającej się w $h = 0.52$, a obserwowanej w kinetyce hydratacji.

Wartości czasów relaksacji poprzecznej składowych sygnału MRJ (a w szczególności składowej stałej) są charakterystyczne dla układów biologicznych. Podobne wartości obserwowano dla *Umbilicaria aprina* oraz *Umbilicaria decussata* [Harańczyk i in., 2008], a także *Ramalina terebrata* [Harańczyk i in., 2012c], liofilizatów błon fotosyntetycznych oraz błon modelowych utworzonych z DGDG [Harańczyk i in., 2009c; Harańczyk i in., 2009a], czy liofilizatów DNA [Harańczyk i in., 2010].

Amplituda całkowitego sygnału cieczowego, $(L_1+L_2)/S = L/S$, w zależności od uwodnienia opisana jest funkcją wymierną. Sugeruje to występowanie procesu rozpuszczania składników tworzących matrycę stałą grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*. W łyku kasztanowca obserwowano podobne zjawisko, z tą różnicą, że dla dużych uwodnień hydratacyjna zależność L/S stała się liniowa – nastąpiło całkowite rozpuszczenie frakcji rozpuszczalnej [Harańczyk i in., 1999]. W badanym grzybie zlichenizowanym proces rozpuszczania zachodzi w całym zakresie uwodnień. Podobne zjawisko obserwowane było w plechach grzyba zlichenizowanego *Umbilicaria aprina* [Harańczyk i in., 2008].

Opracowany model teoretyczny opisujący hydratacyjną zależność L/S pozwolił na oszacowanie średniego stężenia nasycenia substancji rozpuszczającej się w plesze *Cetraria aculeata*, $c_s = 0.57 \pm 0.12$. Wartość ta wskazuje na grupę sacharoza, galaktoza, ksyloza, ryboza i arabinoza. To właśnie tym wielocukrom przypisuje się istotne znaczenie w działaniu mechanizmów odporności na zamarzanie i wysuszenie. Wykonane oznaczenie zawartości wielocukrów i wieloalkoholi w plesze *Cetraria aculeata* nie potwierdziło, że to właśnie te związki odpowiedzialne są za obserwowane rozpuszczanie matrycy stałej (ich stężenie jest około 1000 razy mniejsze niż to, które mogłoby wywołać efekt na obserwowaną skalę).

Nadal więc pozostaje otwarte pytanie, jakie substancje rozpuszczają się w plesze grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* (i innych grzybów zlichenizowanych), a także jaki związek mają z odpornością na zamarzanie i wysuszanie tych organizmów. Wiadomo, że w grzybach zlichenizowanych występują polisacharydy, lichenina i izolichenina, zbudowane z bardzo wielu segmentów sacharozowych. Po wzbudzeniu aktywności fotosyntetycznej plechy może nastąpić proces enzymatyczny hydrolizy tych polisacharydów (prowadzony przez enzymy tnące – lichenazy): $(C_{12}H_{22}O_{11})_x + x \cdot H_2O \xrightarrow{\text{lichenaza}} 2x \cdot C_6H_{12}O_6$. Produktem reakcji są cząsteczki cukrów prostych, glukozy lub sacharozy. Jeśli taki proces nie wystąpi, w plechach obecne będą jedynie śladowe ilości sacharozy. Być może właśnie sterowany proces rozkładu enzymatycznego lichenin odpowiada za obserwowany proces rozpuszczania matrycy stałej *Cetraria aculeata*, a także ma związek z molekularnym mechanizmem działania odporności na zamarzanie i wysuszanie.

W zarejestrowanych widmach można wyodrębnić sygnał pochodzący od protonów ciała stałego, opisany funkcją Gaussa o szerokości połówkowej rzędu 45 kHz oraz uśredniony sygnał pochodzący od protonów ciekowych opisany funkcją Lorentza. Szerokość połówkowa linii Gaussa wskazuje, że zakres pól lokalnych występujących w plechach sięga 1 mT.

Szerokość połówkowa pików Lorentza maleje od około 2.5 kHz do około 1 kHz wraz ze zwiększającym się poziomem uwodnienia plech, potwierdzając, że w uśrednionym sygnale ciekowym coraz większy udział mają protony wody luźno związanej. Widmo składające się z szerokich linii Gaussa oraz znacznie węższych linii Lorentza jest typowym obrazem otrzymywanym dla próbek biologicznych. W plechach *Claudonia mitis*, *Himantormia lugubris* i *Usnea aurantiaco-atra* linia Gaussa miała szerokość 32 – 39 kHz, a linia Lorentza rzędu 1.6 kHz [Harańczyk, 2003]. Plechy *Umbilicaria aprina* charakteryzowały się szerokością połówkową linii Gaussa 37 – 43 kHz oraz linii Lorentza 1.8 – 3.0 kHz [Harańczyk i in., 2012b].

Zależność całkowitego pola powierzchni pod pikiem Lorentza wyrażonego w jednostkach pola powierzchni pod pikiem Gaussa jest opisana funkcją wymierną. Średnie stężenie nasycenia otrzymane z analizy tej zależności wynosi $c_s = 0.62 \pm 0.12$ i jest zbliżone do otrzymanym w pomiarach w domenie czasu.

Pomiary ^1H -MRJ w domenie częstości pokazały, że rezonans magnetyczny spinów jądrowych matrycy stałej plechy zachodzi w innych częstotliwościach niż rezonans spinów ciekowych. Oznacza to, że spiny te znajdują się w różnym otoczeniu magnetycznym.

Pomiary temperaturowe ^1H -MRJ w domenie czasu przeprowadzone w zakresie temperatur od 24°C do -61°C pokazały brak kooperatywnego unieruchamiania molekuł wody (zamarzania) dla uwodnień plech $\Delta m/m_0 < 0.2$. Zaobserwowano natomiast proces niekooperatywnego unieruchamiania molekuł wody objawiający się skracaniem czasu relaksacji poprzecznej przy jednoczesnym braku skokowej zmiany sygnału MRJ, L/S . Ponadto, wraz ze spadkiem temperatury obserwuje się proces transferu puli wody luźno związanej w pulę wody ściśle związanej. Podobny proces zaobserwowany został w plechach *Umbilicaria aprina* [Harańczy i in., 2012], a także *Cladonia mitis*, [Harańczyk, 2003]. W plechach *Cetraria aculeata* przemiana ta rozpoczyna się już w temperaturach powyżej 0°C .

W plechach badanych uwodnionych do wysokich poziomów zaobserwowano proces tworzenia krystalitów lodu (kooperatywnego unieruchomienia molekuł wody). Dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.499$, w temperaturach między -6.5°C a -15.6°C , obserwuje się gwałtowny spadek sygnału MRJ, L/S , odpowiadający ubytkowi ilości wody $\Delta m/m_0 = 0.12$. Sygnał MRJ plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.964$, charakteryzuje się gwałtownym spadkiem w zakresie temperatur między 0°C a -6.5°C , któremu odpowiada ubytek masy o $\Delta m/m_0 = 0.55$. Na podstawie liniowej estymacji zależności ilości zamarzającej wody od poziomu uwodnienia plech, wyznaczono progową wartość uwodnienia plech wynoszącą $\Delta m/m_0 = 0.41$, powyżej której w plechach dochodzi do tworzenia lodu. Tak wyznaczoną wartość graniczną potwierdzają pomiary ^1H -MRJ w domenie częstości, pomiary DSC, a także oznaczenia przeżywalności komórek fotobionta w plechach poddanych mrożeniu. Analiza pomiarów temperaturowych ^1H -MRJ w domenie częstości pozwala stwierdzić, że dla niskich poziomów uwodnień plech (mniejszych niż $\Delta m/m_0 = 0.343$) nie obserwuje się procesu tworzenia krystalitów lodu. Skokową zmianę sygnału MRJ, A_L/A_G , obserwuje się dopiero dla plech uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.482$.

Wraz z malejącą temperaturą stwierdzono przesuwanie się w kierunku wyższych częstotliwości centrów pików Gaussa i Lorentza. Prawdopodobnie jest to związane z narastającym unieruchomieniem molekuł (słabnące ruchy termiczne), a więc wzmaganiem się lokalnych pól wpływających na otoczenie magnetyczne, w których znajdują się protony, od których pochodzi mierzony sygnał.

Zarówno pomiary ^1H -MRJ w domenie czasu jak i częstości nie ujawniły zjawiska histerezy ze względu na ochładzanie i ogrzewanie plech *Cetraria aculeata*.

Pomiary kalorymetryczne DSC potwierdziły obserwacje wynikające z pomiarów MRJ dotyczące zamarzania wody związanej w plechach *Cetraria aculeata*. Na podstawie liniowej

zależności entalpii obserwowanych przejść fazowych od uwodnienia stwierdzono, że zamarzanie zachodzi dla uwodnień powyżej $\Delta m/m_0 = 0.56$, a topnienie $\Delta m/m_0 = 0.36$. U grzyba zlichenizowanego *Umbilicaria aprina* zaobserwowano, że graniczny poziom uwodnienia plechy, powyżej którego zachodzi zamarzanie wynosi $\Delta m/m_0 = 0.202$, a topnienie $-\Delta m/m_0 = 0.127$ [Harańczyk i in., 2012]. Wyższe wartości uwodnień granicznych dla plechy *Cetraria aculeata* mogą wskazywać, że mechanizmy obronne przed przemarzaniem działają sprawniej u krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych niż u listkowatych.

Temperatura zamarzania i topnienia liniowo zależą od uwodnienia plechy, jednakże temperatura zamarzania jest o około 10°C – 15°C niższa niż temperatura topnienia. Podobny efekt został zaobserwowany w plechach *Umbilicaria aprina* [Harańczyk i in., 2012]. W innych układach biologicznych, których cechuje odporność na skrajnie trudne warunki środowiskowe, np. ziarnach, zmartwychwstankach [Crowe, 2002], czy larwach owadów wykryto przejścia fazowe II rodzaju (przejścia szkliste) związane z występowaniem układu woda-cukier. W larwach *Polypedilum vanderplanki* przejście szkliste związane było z dużą zawartością trehalozy, wielocukru, któremu przypisuje się duże znaczenie w ochronie przed negatywnymi skutkami drastycznego odwodnienia tych organizmów [Watanabe i in., 2003]. W przypadku badanych plech *Cetraria aculeata* nie stwierdzono przejścia szklistego, podobnie jak w przypadku innych badanych grzybów zlichenizowanych.

Pomiary MRJ oraz DSC wskazują, że w plechach *Cetraria aculeata* istnieje aktywny mechanizm ochrony przed zamarzaniem. Wydaje się, że mechanizm ten opiera się na dwóch procesach – przekształceniu puli wody luźno związanej w niezamarzającą, ściśle związaną oraz działaniu krioprotektywnym substancji zawartych w plesze i należy do typu mechanizmów nakierowanych raczej na unikanie zamarzania niż jego tolerowanie. Taka strategia (unikanie zamarzania) jest znana u owadów, z jej istnieniem wiąże się duże zawartości wieloalkoholi takich jak: glicerol, sorbitol czy mannitol oraz cukrów: trehaloza, glukoza i fruktoza [Duman, 1991; Miller, Werner, 1980]. Wyniki otrzymane dla plech *Cetraria aculeata* nie uprawniają do stwierdzenia, że odpowiedzialne są za tę strategię wielocukry i wieloalkohole obecne ciągle w tym samym stężeniu. Wydaje się, że takie substancje mogą pojawiać się dopiero po skomplikowanej akcji enzymatycznej (rozkład licheniny i izolicheniny) zachodzącej w odpowiednich warunkach. Mechanizm obrony przed zamarzaniem skuteczny jest tylko do określonego poziomu uwodnienia.

W badaniach uśmierconych plech *Cetraria aculeata* stwierdzono, że poziom fotosyntezy (zależny od warunków klimatycznych) nie ma istotnego wpływu na proces

wiązania wody do matrycy stałej grzyba zlichenizowanego (podobne parametry kinetyk hydratacji i izoterm sorpcyjnych) natomiast może wpływać na zjawisko rozpuszczania matrycy stałej i jej skład. Plechy, w których poziom fotosyntezy był wysoki (zebrane w dzień słoneczny) charakteryzują się wyższym stężeniem nasycenia substancji rozpuszczanej ($c_s = 0.81 \pm 0.22$) niż te, które zostały zebrane w dzień pochmurny, a więc w których poziom fotosyntezy przed uśmierceniem był niski ($c_s = 0.53 \pm 0.22$). Takie różnice mogą wskazywać, że akcja enzymatyczna odpowiedzialna za proces rozpuszczania przebiega w różny sposób w obu rodzajach plech.

W oparciu o pomiary wykorzystujące sekwencję impulsową *soft* – *hard* zauważono proces transferu magnetyzacji między pulą spinów ciała stałego a pulą spinów ciekłych. Ustalono, że stała wymiany wynosi 330 s^{-1} . Jest to niewielka wartość w porównaniu ze stałą szybkości relaksacji poprzecznej dla plech *Cetraria aculeata* wynoszącą $4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$, co sugeruje, że transfer magnetyzacji między układami spinów nie ma wpływu na proces relaksacji spinowo-spinowej. Pomiary czasów protonowej relaksacji podłużnej przeprowadzone w oparciu o sekwencję impulsów *hard* (π)- *hard* ($\pi/2$) pozwoliły na wyodrębnienie ze składowej stałej oraz składowej ciekłej dwóch podukładów. Inaczej niż w przypadku relaksacji poprzecznej, wydaje się, że poziom uwodnienia wpływa na proces relaksacji podłużnej, bowiem czasy relaksacji składowej zarówno składowej stałej i jak i składowej ciekłej silnie zależą od poziomu uwodnienia (Tabela 12.1). Dwie składowe sygnały od protonów ciała stałego mogą być związane z obecnością dwóch rodzajów komórek: mykobionta oraz fotobionta.

VI. WNIOSKI

1. Kinetyka dehydratacji żywych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* jest eksponencjalna i scharakteryzowana czasem dehydratacji $t^d = (10.17 \pm 0.66)$ h. W plesze znajduje się frakcja wody bardzo mocno związanej ($\Delta m/m_0 = 0.03056 \pm 0.0030$), nieusuwalna w procesie dehydratacji nad żelem krzemionkowym. Frakcję tę można usunąć poprzez 72 h prażenie w temperaturze 70°C.

2. Kinetyka hydratacji plech *Cetraria aculeata* ujawnia obecność czterech różnych frakcji wody o różnym stopniu wiązania do plechy:

(i) woda bardzo silnie związana o czasie hydratacji rzędu kilku minut i udziale $\bar{A}_0^h = (0.040 \pm 0.017)$,

(ii) woda ściśle związana, o udziale stopniowo rosnącym w wilgotnościach względnych $h = 0.09 - 0.52$ (scharakteryzowanej czasem $\bar{t}_1^h = (0.43 \pm 0.10)$ h oraz nasycającej się na poziomie $A_1^{h=0.52} = 0.0393 \pm 0.0011$,

(iii) woda luźno związana, pojawiająca się dla $h = 0.63$ oraz o udziale stopniowo narastającym dla wilgotności względnych rosnących do $h = 0.63$ do $h = 0.97$ scharakteryzowanej czasem hydratacji $\bar{t}_2^h = (14.2 \pm 6.2)$ h, oraz dla $h = 1$ nasycającej się na poziomie $A_2^{h=0.97} = 0.4425 \pm 0.0055$,

(iv) woda luźno związana (lub swobodna) pojawiająca się jedynie w wilgotności względnej $h = 1$ o czasie hydratacji $\bar{t}_3^h = (45.5 \pm 7.7)$ h, oraz udziale $A_3^h = 0.82 \pm 0.14$.

3. Izoterma sorpcyjna dla żywych i martwych plech grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* daje się skutecznie opisać modelem Denta. Ilość wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące, wynosi $\Delta M/m_0 = 0.0457 \pm 0.0032$, stosunek liczby miejsc wiążących $k+1$ molekuł wody do liczby wiążącej k molekuł ($k > 0$) wynosi $b = 0.9577 \pm 0.0032$, a udział nieobsadzonych pierwotnych miejsc wiążących dla $h = 1$ wynosi $1/b_1 = 0.9$ %.

4. W funkcji zaniku swobodnej precesji ^1H -MRJ żywych plech *Cetraria aculeata* wyróżniono sygnał pochodzący od matrycy stałej plechy a opisany funkcją Gaussa lub funkcją Abragama, oraz jedną lub dla wyższych uwodnień plechy, dwie składowe pochodzące od frakcji wody związanej w plesze, a różniących się mobilnością.

Średni czas relaksacji poprzecznej składowej sygnału FID stałej wynosi $T_{2s}^* \approx 25 \mu\text{s}$, składowej pochodzącej od wody ściśle związanej $T_{2L1}^* \approx 120 \mu\text{s}$, a składowej pochodzącej od wody luźno związanej $T_{2L2}^* \approx 560 \mu\text{s}$. Średnia wartość parametru a funkcji Abragama wynosi $a \approx 0.1 \mu\text{s}^{-1}$ co odpowiada szerokości połówkowej linii równej 32 kHz. Szerokość linii otrzymanej w pomiarach w domenie częstości jest równa około 45 kHz.

5. Widma ^1H -MRJ plech żywych komórek opisane były złożeniem funkcji Gaussa (sygnał pochodzący od protonów matrycy stałej plechy) oraz funkcji Lorentza (sygnał pochodzący od jednej, uśrednionej składowej cieczowej od wszystkich frakcji wody związanej w plesze) w całym zakresie badanych uwodnień. Średnia szerokość połówkowa linii Gaussa wynosi około 45 kHz, a linii Lorentza – 1.2 kHz. Pola lokalne określone przez szerokość linii ciała stałego wynoszą $\Delta B_{\text{lok}} \approx 1 \text{ mT}$.

6. Odkryto, że w plechach *Cetraria aculeata* zachodzi proces rozpuszczania matrycy stałej wraz z powrotem organizmu ze stanu kryptobiozy do stanu normalnej aktywności życiowej. Zależności hydratacyjne sygnału ^1H -MRJ w domenie czasu i częstości są opisane funkcją wymierną. Średnie stężenie nasycenia substancji rozpuszczalnych wynosi około $c_s = 0.6$.

7. Oznaczenia poziomu wielocukrów i wieloalkoholi w plechach grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* pozwalają stwierdzić, że ich zawartość w suchej plesze jest o trzy rzędy wielkości mniejsza niż ta, która mogłaby wywołać obserwowany efekt.

8. Badania plech martwych *Cetraria aculeata* pokazały, że poziom fotosyntezy nie ma znaczącego wpływu na proces wiązania wody do matrycy stałej plechy (znikome różnice w parametrach kinetyk dehydratacji, hydratacji, izotermi sorpcyjnej), natomiast znacząco wpływa na proces rozpuszczania frakcji rozpuszczalnej plechy. Stwierdzono znaczące różnice

w średnim stężeniu nasycenia frakcji stałej rozpuszczalnej u plech zebranych w dzień słoneczny, $c_s = 0.81 \pm 0.22$, oraz w dzień pochmurny, $c_s = 0.53 \pm 0.22$.

9. Odkryto, że w plechach grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* istnieje mechanizm odporności na zamarzanie polegający na przemianie frakcji wody luźno związanej w wodę ściśle związaną wraz z temperaturą jeszcze powyżej 0°C . Mechanizm ten skutecznie chroni przed powstaniem krystalitów lodu, gdy uwodnienie plechy nie przekracza $\Delta m/m_0 = 0.41$. Dla wyższych uwodnień obserwuje się tworzenie krystalitów lodu w plesze (kooperatywne unieruchomienie molekuł wody). 10. Na podstawie pomiarów kalorymetrycznych DSC ustalono, że wartość progowa uwodnienia plech, powyżej której obserwuje się zamarzanie wynosi $\Delta m/m_0 = 0.556$, a topnienie $\Delta m/m_0 = 0.363$. Zależność entalpii przejścia jest liniową funkcją uwodnienia zarówno w przypadku ochładzania jak i ogrzewania plechy, jednak dla plech chłodzonych temperatury onsetów rejestrowanych pików są niższe o 10 do 15°C . W plechach *Cetraria aculeata* przejścia II rodzaju (szklistego) nie zaobserwowano.

10. W plesze *Cetraria aculeata* zachodzi zjawisko transferu magnetyzacji protonowej między matrycą stałą plechy a wodą związaną. Stała czasowa opisująca proces wymiany wynosi $t \approx 3.2$ ms.

11. Pomiary spektroskopii relaksacyjnej pokazały dla matrycy stałej plechy dwa czasy relaksacji spinowo-sieciowej. Podobnie dla linii pochodzącej od wody związanej w plesze można wyodrębnić dwa czasy relaksacji spinowo-sieciowej. Takie zachowanie jest charakterystyczne dla reżimu wymiany częściowej magnetyzacji między oboma podukładami protonów.

12. Stwierdzono, że aktywność fotosyntetyczna, rozumiana jako stosunek energii wykorzystanej w procesie fotosyntezy do całkowitej energii pochłoniętej przez komórki fotobionta grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata* jest stałą funkcją hydratacji plechy i wynosi około 23%. W miarę wzrostu uwodnienia plechy zwiększają się obszary rozpoczynające proces fotosyntezy.

13. Żywotność komórek fotobionta jest największa dla plech uwodnionych do niskich poziomów ($\Delta m/m_0 \approx 0.04$), wówczas proces mrożenia nie zmniejsza ich przeżywalności. Przeżywalność komórek maleje znacząco wraz ze wzrostem uwodnienia komórek. Dla uwodnień powyżej progowego poziomu, w którym tworzony jest krystalit lodu zamrażanie przeżywają jedynie pojedyncze komórki fotobionta.

Literatura

- [1] Abragam A., *The principles of nuclear magnetism*, Oxford, Clarendon Press, (1961).
- [2] Bertie J.E., Calvert L.D., Whalley E., Transformations of Ice II, Ice III, and Ice V at Atmospheric Pressure, *Journal of Chemical Physics*, **38**, 840-847, (1963).
- [3] Bertie J.E., Calvert L.D., Whalley E., Transformations of ice VI and ice VII at atmospheric pressure, *Canadian Journal of Chemistry*, **42**, 1373-1378, (1964).
- [4] Blackman M., Lisgarten N.D., Electron diffraction investigations into the cubic and other structural forms of ice, *Advances in Physics*, **7**, 189-198, (1958).
- [5] Blicharski J.S., *Efekty interferencyjne w magnetycznym rezonansie jądrowym*, IFJ, Raport Nr 792/PL, Kraków, (1972).
- [6] Blicharski J.S., Jasiński G., Klose G., Nuclear spin relaxation in periodically perturbed systems iv. The relaxation in the presence of double rotation and pulse sequence, *Acta Physica Polonica A*, **86**, 1001-1005, (1994).
- [7] Bragg W.H., The crystal structure of ice, *Proceedings of the Physical Society of London*, **34**, 98-103, (1922).
- [8] Buiteveld H., Hakvoort J.M.H., Donze M., The optical properties of pure water, in: *SPIE Proceedings on Ocean Optics XII*, edited by J. S. Jaffe, **2258**, 174-183, (1994)
- [9] Bystrek J., *Podstawy lichenologii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej, Lublin, (1997).
- [10] Chapman B.E., Roser D.J., Seppelt R.D., ^{13}C NMR analysis of Antarctic cryptogam extracts, *Antarctic Science*, **6**, 295-305, (1994).
- [11] Chen S.H., Teixeira J., Structure and dynamics of Low Temperature Water Studied by Scattering Techniques, *Advances in Chemical Physics*, **64**, 1-41, (1985).
- [12] Coulson C.A., The hydrogen bond – a review of the present position, *Research, London*, **10**, 149, (1957).
- [13] Crowe L.M., Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **A131**, 505-513, (2002).
- [14] Derbyshire W., van den Bosch M., van Dusschoten D., MacNaughtan W., Farhat I.A., Hemming M.A., Mitchell J.R., Fitting of the beat pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate–water solutions, *Journal of Magnetic Resonance*, **168**, 278–283, (2004).

- [15] Dowell L.G., Rinfert A.P., Low temperature forms of ice as studied by X-ray diffraction, *Nature*, **188**: 1144–1149, (1960).
- [16] Duman, J.G., Wu D.W., Xu L., Tursman D., Olsen T. M, Adaptation of insects to subzero temperature, *The Quarterly Review of Biology*, **66**, 387-410, (1991).
- [17] Edmonds A.R., Angular momentum in Quantum Mechanics. Princeton University Press, (1957).
- [18] Eisenberg D., Kauzmann W., The structure and properties of water, Clarendon Press, Oxford, (1969).
- [19] Gaff D.F., Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. *Oecologia (Berl.)*, **31**, 95-109, (1977).
- [20] Galun M., *Handbook of Lichenology*, **1**, CRC Press Inc., Boca Ration, (1988 a).
- [21] Galun M., *Handbook of Lichenology*, **2**, CRC Press Inc., Boca Ration, (1988 b).
- [22] Gordon M., Taylor J.S., Ideal copolymers and the second order transitions of synthetic rubbers 1. Non-crystalline copolymers, *Journal of Applied Chemistry*, **2**, 493-500, (1952).
- [23] Graham B., Patterson B.D., Responses of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism. and acclimation, *Annual Reviec of Plant Physiology*, **33**, 347 - 372, (1982)
- [24] Harańczyk H., *On Water in Extremely Dry Biological Systems*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, (2003).
- [25] Harańczyk H., Bacior M., Jamróz J., Jemioła-Rzemińska M., Strzałka K., Rehydration of Digalactosyldiacylglycerol Model Membrane Lyophilizates Observed by NMR and Sorption Isotherm, *Acta Physica Polonica A*, **115**, 521-525, (2009a).
- [26] Harańczyk, Bacior M., Jastrzębska P., Olech M.A., Deep dehydration of Antarctic lichen *Leptogium puberulum* Hue observed by NMR and sorption isotherm, *Acta Physica Polonica A*, **115**, 516-520, (2009b).
- [27] Harańczyk H., Bacior M., Olech M.A., Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm, *Antarctic Science*, **20**, 527-535, (2008).
- [28] Harańczyk H., Czak J., Nowak P., Nizioł J., Initial phases of DNA rehydration by NMR and sorption isotherm, *Acta Physica Polonica A*, **117**, 257-262, (2010).
- [29] Harańczyk H., Florek M., Nowak P., Knutelski S., Water Bound in Elytra of the Weevil *Liparus glabrirostris* (Küster, 1849) by NMR and Sorption Isotherm (Coleoptera: Curculionidae), *Acta Physica Polonica A*, **121**, 491-496, (2012a).

- [30] Harańczyk H., Gałdziński S., Olech M.A., Initial stages of lichen hydration observed by proton magnetic relaxation, *New Phytologist*, **138**, 192–202, (1998).
- [31] Harańczyk H., Gałdziński S., Olech M.A., Freezing protection mechanism in *Cladonia mitis* as observed by proton magnetic relaxation, New Aspects in Cryptogamic Research, Contribution in Honour of Ludger Kappen, *Bibliotheca Lichenologica*, **75**, 265-274, (2000).
- [32] Harańczyk H., Leja A., Jemioła-Rzemińska M., Strzałka K., Maturation processes of photosynthetic membranes observed by proton magnetic relaxation and sorption isotherm, *Acta Physica Polonica A*, **115**, 526-532, (2009c).
- [33] Harańczyk H., Leja A., Strzałka K., The effect of water accessible paramagnetic ions on subcellular structures formed in developing wheat photosynthetic membranes as observed by NMR and by sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A*, **109**, 389-398, (2006a).
- [34] Harańczyk H., Nowak P., Baciór M., Lisowska M., Marzec M., Florek M., Olech M.A., Bound water freezing in *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica, *Antarctic Science*, **24**, 342-352, (2012b).
- [35] Harańczyk H., Pater Ł., Nowak P., Baciór M., Olech M.A., Initial phases of Antarctic *Ramalina terebrata* Hook f. & Taylor thalli rehydration observed by proton relaxometry, *Acta Physica Polonica A*, **121**, 478-482, (2012c).
- [36] Harańczyk H., Pietrzyk A., Leja A., Olech M.A., Bound water structure on the surface of *Usnea Antarctica* as observed by NMR and sorption isotherm *Acta Physica Polonica A*, **109**, p. 411, (2006b).
- [37] Harańczyk H., Weglarz W. P., Sojka S., The Investigation of Hydration Processes in Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) and Pine (*Pinus silvestris* L.) Bark and Bast Using Proton Magnetic Relaxation, *Holzforschung*, **53**, issue 3, 299–310, (1999).
- [38] Harris C.W., Lichens: Cetraria, *The Bryologist*, **4**, no. 3, 41 – 45, (1901).
- [39] Hauck M., Susceptibility to acidic precipitation contributes to the decline of the terricolous lichens *Cetraria aculeata* and *Cetraria islandica* in central Europe, *Environmental Pollution*, **152**, issue 3, 731 – 735, (2008).
- [40] Hawksworth D.L., Rose F., Qualitative Scale for estimating Sulphur Dioxide Air Pollution in England and Wales using Epiphytic Lichens, *Nature*, **227**, 145 - 148, (1970).
- [41] Hennel J.W., *Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, (1966).

- [42] Hubbard P.S., Quantum-mechanical and semiclassical forms of the density operator theory of relaxation, *Review of Modern Physics*, **33**, 249-264, (1961).
- [43] Kaernefelt I., The genera Bryocaulon, Coelocaulon and Cornicularia and formerly associated taxa, *Opera Botanica*, **86**, (1986).
- [44] Kamb A., Prakash A., Knobler C., Structure of ice V. *Acta crystallographica*, **22**, 706-715, (1967).
- [45] Kamb B., Ice II: A proton ordered form of ice. *Acta crystallographica*, **17**, 1437-1449, (1964).
- [46] Kamb B., Datta S.K. 1960. Crystal Structures of the High- Pressure Forms of Ice: Ice III. *Nature*, **187**, 140-141, (1960).
- [47] Kappen L., Water relations and net photosynthesis of *Usnea*. A comparison between *Usnea fasciata* (maritime Antarctic) and *Usnea sulphurea* (continental Antarctic), *Lichen physiology and cell biology*, 41 -56, Plenum Press, New York, (1985)
- [48] Kappen L., Ecology and physiology of the Antarctic fruticose lichen *Usnea sulphurea*, *Polar Biology*, **1**, 249-255, (1983).
- [49] Kappen L., Field measurements of carbon dioxide exchange of Antarctic lichen *Usnea Sphacelata* in the frozen state, *Antarctic Science*, **1**, 31-34, (1989).
- [50] Kappen L., Plant Activity under Snow and Ice, with Particular Reference to Lichens, *Arctic*, **46**, no. 4, 297-302, (1993).
- [51] Kappen L., Breuer M., Ecological and physiological investigations in continental Antarctic cryptogams II. Moisture relations and photosynthesis of lichens near Casey Station, Wilkes Land, *Antarctic Science*, **3**, 273-278, (1991).
- [52] Kappen L., Schroeter B., Hestmark G., Winkler J.B., Field measurements of photosynthesis of umbilicarious lichens in winter, *Botanica Acta*, **109**, 292-298, (1996).
- [53] Kappen L., Sommerkom M., Schroeter B., Carbon acquisition and water relations of lichens in polar regions-potentials and limitations, *Lichenologist*, **27**, 531-545, (1995).
- [54] Kieft T., Ruscetti T., Characterization of Biological Ice Nuclei from a Lichen, *Journal of Bacteriology*, **172**, no. 6, 3519-3523, (1990).
- [55] Koza M., Schober H., Tlle A.,Fujara F., Hansen T., Formation of ice XII at different conditions, *Nature*, **397**, 660-661, (1999).
- [56] Mikułko A., Collective and molecular modes in antiferroelectric phases studied by complementary methods, Praca doktorska, Instytut Fizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, (2006).

- [57] Miller L.K., Werner R. 1980. Supercooling to -60°C: an extreme example of freezing avoidance in northern willow gall insects, *Cryobiology*, **17**, 621-622, (1980).
- [58] Lange O.L., Der CO₂-Gaswechsel von Flechten bei tiefen Temperaturen, *Planta*, **64**, 1-19, (1965).
- [59] Langumir, I. 1918. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society*, **40**, 1361-1403.
- [60] Latimer W.M., Rodebush W.H., Polarity and Ionization from the Standpoint of the Lewis Theory of Valence. *Journal of the American Chemical Society*, **42**, 1419- 1433, (1920).
- [61] Lehninger A.L, 1979, *Biochemia*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, (1979).
- [62] Lenk R.1986. *Fluctuations, diffusion and spin relaxation*, Elsevier, Amsterdam, (1986).
- [63] Liška J., Vázaný a nevázaný život lišejníků, *Vesmír*, **79** (130), 623-629, (2000).
- [64] Loerting T., Giovambattista N., Amorphous ices: experiments and numerical simulations, *Journal of Physics: Condensed Matter*, **18**, R919-R977, (2006).
- [65] Loerting T., Salzman C., Kohl I., Meyer E., Hallbrucker A., A second distinct structural "state" of high-density amorphous ice at 77 K and 1 bar, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **3**, 5355-5357, (2001).
- [66] Matwiejuk A., *Porosty i ich właściwości lecznicze*, Kosmos – problemy nauk biologicznych, nr 1-2 (278-279), 85-91, (2008).
- [67] Nash T. H. III, Kappen L., Loesch R., Matthes – Sears U., Larson D. W., Cold resistance of lichens with Trentepohlia or Trebouxia - photobionts from the North American West Coast, Progress and Problems In Lichenology in the Eighties, *Bibliotheca Lichenologica*, **25**, 313 – 317, (1987).
- [68] Owston P.G., The structure of ice-I, as determined by x-ray and neutron diffraction analysis, *Advances in Physics*, **7**, 171-188, (1958).
- [69] Pake G.E., Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line, *Journal of Chemical Physics*, **16**, 327 – 336, (1948).
- [70] Perez-Ortega S., Fernandez-Mendoza F., Raggio J., Vivas M., Ascaso C., Sancho L.G., Printzen C., de los Rios A., Extreme phenotypic variation in *Cetraria aculeata* (lichenized Ascomycota): adaptation or incidental modification?, *Annals of Botany*, **109**, 1133-1148, (2012).
- [71] Pintar M.M, Some considerations of the round table subject, *Magnetic Resonance Imaging*, **9**, 753-754, (1991).

- [72] Podbielkowski Z., Reymont-Grochowska I., Skirgiełło A., *Rośliny zarodnikowe*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, (1982).
- [73] del Prado R., Sancho L.G., Water relations and photosynthetic performance of fruticose lichens from the semi-arid Southeast of Spain, *Flora*, **195**, 51–60, (2000).
- [74] Quickenden T.I., J.A. Irvin, *Journal of Chemical Physics*, **72**, 4416-4428, (1980).
- [75] Radomski J., Jasnowska J., *Botanika*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, (1976).
- [76] Rao C.N.R., Theory of hydrogen bonding in water. In: *Water, a comprehensive treatise, vol. 1: The physics and physical chemistry of water*, Plenum Press, New York-London, 93-114, (1972).
- [77] Redfield A.G., On the theory of relaxation processes, *IBM Journal*, **1**, 19-31, (1957).
- [78] Rose C.I., Hawksworth D.L., Lichen recolonization in London's cleaner air, *Nature*, **289**, 289 – 292, (1981).
- [79] Rose M.E., Elementary theory of angular momentum, New York, Wiley, (1957).
- [80] Roser D.J., Melick D.R., Ling H.U., Seppelt R.D., Polyol and sugar content of terrestrial plants from continental Antarctica, *Antarctic Science* **4**, 413-420, (1992).
- [81] Rumm R.J., *An NMR Study of Cortical Bone*, A thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Physics, Waterloo, Ontario, Canada, (1992).
- [82] Salzmann C.G., Kohl I., Loerting T., Mayer E., Hallbrucker A., Raman Spectroscopic Study on Hydrogen Bonding in Recovered Ice IV, *Journal of Physical Chemistry B*, **107**, 2802-2807, (2003a).
- [83] Salzmann C.G., Kohl I., Loerting T., Mayer E., Hallbrucker A., The low-temperature dynamics of recovered ice XII as studied by differential scanning calorimetry: a comparison with ice V, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **5**, 3507–3517, (2003b).
- [84] Sancho L.G., Valladares F., Schroeter B., Kappen L., Ecophysiology of Antarctic versus temperate populations of a bipolar lichen: The key role of the photosynthetic partner, *Antarctic Ecosystems: Models of wider ecological understanding*, 190 – 194, (2000).
- [85] Schroeter B., Green T.G.A., Kappen L., Seppelt R.A., Carbon dioxide exchange at subzero temperatures: field measurements on *Umbilicaria aprina* in Antarctica, *Crypt. Bot.*, **4**, 233–241, (1994).
- [86] Schroeter B., Olech M.A., Kappen L., Heitland W., Ecophysiological investigations of *Usnea antarctica* in the maritime Antarctic. Annual microclimatic conditions and potential primary production, *Antarctic Science*, **7**, 251-260, (1995a).

- [87] Schroeter B., Scheidegger C., Water relations in lichens at subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide exchange in lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica, *New Phytologist*, **131**, 273 – 285, (1995b).
- [88] Stillinger F.H., Water revisited, *Science* **209**, 451-457, (1980).
- [89] Studzińska E., Witkowska – Banaszcak E., Bylka W., Związki biologicznie aktywne porostów, *Herba Polonica*, **54**, no 1, (2008).
- [90] Suresh S.J., Naik V.M., Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data, *Journal of Chemical Physics*, **113**, 9727-9732, (2000).
- [91] Szczepanowicz B., *Atlas roślin biblijnych*, Wydawnictwo WAM, Kraków, (2003).
- [92] Szweykowska A., Szweykowski J., *Botanika – systematyka*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, (2002).
- [93] *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological*, Rahway, N.J., U.S.A.: Merck, New York, (1996, 2006).
- [94] Tobolewski Z., *Porosty – klucz do oznaczania najpospolitszych gatunków krajowych*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa (1972).
- [95] de la Torre R., Sancho L.G., Horneck G., de los Ríos A., Wierzchos J., Olsson-Francis K., Cockell C.S, Rettberg P., Berger T., de Vera J.P.P., Ott S., Frías J.M., Gonzalez-Melendi P., Lucas M.M., Reina M., Pintado A., Demets R., Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – Results of the *Lithopanspermia* experiments, *Icarus*, **208**, 735-748, (2010).
- [96] Urquidi J., Benmore C.J., Egelstaff P.A., Guthrie M., McLain S.E., Tulk C.A, Klug D.D, Turner J.F.C, A structural comparison of supercooled water and intermediate density amorphous ices, *Molecular Physics*, **102**, 2007-2014, (2004).
- [97] Wangsness R.K. Bloch F., The dynamical theory of nuclear induction, *Physics Review*, **89**, 728-739, (1953).
- [98] Watanabe M., Kikawada T., Okuda T., Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *Journal of Experimental Biology*, **206**, 2281-2286, (2003).
- [99] Warren S.G., Optical-constants of ice from the ultraviolet to the microwave, *Applied Optic*, **23**, 1206-1225, (1984).
- [100] Weast R.C., 1974-75, *Handbook of Chemistry and Physics*, 55-ed, CRC Press Inc., (1974-75).

- [101] Węglarz W.P., Harańczyk H., Two-dimensional analysis of the nuclear relaxation function in the time domain: the program CracSpin, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **33**, 1909-1920, (2000).
- [102] Wigner A.P., *Group theory*, New York Academic Press, New York, (1959).
- [103] Witek, M., *Badanie magnetycznej relaksacji jądrowej w amorficznych układach biologicznych*, Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, (2006).
- [104] Worland M.R., Block W., Oldale H., Ice nucleation activity in biological materials with examples from Antarctic plants, *Cryo-letters*, **17**, n. 1, pp. 31-38, (1996).
- [105] Wróbel S., Marzec M, Różnicowa kalorymetria skaningowa, w: *Komplementarne metody badań przemian fazowych*, redakcja Mikuli E., Migdał-Mikuli A., Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, (2006).

Spis publikacji autora

- [1] Harańczyk H., Czak J., Nowak P., Nizioł J., Initial phases of DNA rehydration by NMR and sorption isotherm, *Acta Physica Polonica A*, **117**, 257-262, (2010).
- [2] Harańczyk H., Florek M., Nowak P., Knutelski S., Water Bound in Elytra of the Weevil *Liparus glabrirostris* (Küster, 1849) by NMR and Sorption Isotherm (Coleoptera: Curculionidae), *Acta Physica Polonica A*, **121**, 491-496, (2012).
- [3] Harańczyk H., Kobierski J., Zalitacz D., Nowak P., Romanowicz A., Marzec M., Nizioł J., Rehydration of surfactant modified DNA powders by proton NMR, *Acta Physica Polonica A*, **121**, pp. 485-490, (2012).
- [4] Harańczyk H., Nowak P., Bacior M., Lisowska M., Marzec M., Florek M., Olech M.A., Bound water freezing in *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica, *Antarctic Science*, **24**, 342-352, (2012).
- [5] Harańczyk H., Pater Ł., Nowak P., Bacior M., Olech M.A., Initial phases of Antarctic *Ramalina terebrata* Hook f. & Taylor thalli rehydration observed by proton relaxometry, *Acta Physica Polonica A*, **121**, 478-482, (2012).
- [6] Harańczyk H., Nowak P., Lisowska M., Florek – Wojciechowska M., Lahuta L.B., Olech M.A., Water-soluble solid fraction saturation concentration in dry organism evaluated from ^1H -NMR relaxometry, *in vivo*, wysłane do druku w *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, (2013).
- [7] Nowak P., Harańczyk H., Marzec M., Lisowska M., Olech M.A., Freezing resistance of Antarctic lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) observed by ^1H -NMR, wysłane do druku w *Polar Biology*, (2013).

Spis rysunków

Rys. 1.1. Przekrój przez plechę grzyba zlichenizowanego.....	14
Rys. 1.2. Morfologiczne rodzaje plech grzybów zlichenizowanych.....	14
Rys. 1.3. <i>Cetraria aculeata</i> : skupisko grzybów zlichenizowanych oraz powiększenie plechy z widocznymi wypustkami	25
Rys. 2.1. Zależność współczynnika absorpcji promieniowania elektromagnetycznego od długości fali.....	26
Rys. 2.2. Molekuły wody w fazie skondensowanej	28
Rys. 2.3. Lód w fazie Ih.....	29
Rys. 2.4. Diagram fazowy dla wody z uwzględnieniem różnych struktur lodu.....	30
Rys. 3.1. Sfera o promieniu 1 obrazująca położenie spinów molekuł	56
Rys. 3.2. Przykładowy kształt dublet Pake’a dla polikryształu.....	57
Rys. 3.3. Sekwencja impulsów stosowana w metodzie <i>solid echo</i>	58
Rys. 3.4. Sekwencja impulsów w metodzie CPMG.....	59
Rys. 3.5. Związek między sygnałem MRJ frakcji stałej w domenie czasu i domenie częstości	60
Rys. 3.6. Sekwencja <i>soft – hard</i>	63
Rys. 4.1. Przyłączanie się molekuł wody do adsorbenta wg modelu Denta.....	66
Rys. 4.2. Przyłączanie się molekuł wody do adsorbenta wg modelu BET.....	70
Rys. 4.3. Przyłączanie się molekuł wody do adsorbenta wg modelu Langmuira.....	71
Rys. 4.4. Symulacja porównująca modele Langmuira, BET i Denta izotermy sorpcyjnej.....	72
Rys. 4.5. Symulacja porównująca modele Langmuira, BET i Denta dla danych przedstawionych w formie parabolicznej.....	74
Rys. 5.1. Schemat blokowy regulatora spektrometru impulsowego HB56.....	80
Rys. 5.2. Schemat blokowy regulatora temperatury UNIPAN typ 650.....	81
Rys. 5.3. Spektrometr Bruker Avance III.....	82
Rys. 5.4. Schemat ukazujący spektrometr z podziałem na poszczególne jednostki oraz zewnętrzny przedwzmacniacz HPPR.....	83
Rys. 5.5. Uproszczony schemat kompensacyjnego kalorymetru DSC.....	84
Rys. 5.6. Skalowanie kalorymetru DSC.....	85

Rys. 6.1. Powierzchnia plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i> w powiększeniu.....	92
Rys. 6.2. Obrazy wnętrza odcinka dolnego plechy <i>Cetraria aculeata</i> w powiększeniu....	94
Rys. 6.3. Obrazy rozgałęziania plechy <i>Cetraria aculeata</i> w powiększeniu	95
Rys. 6.4. Obrazy odcinków górnych plechy <i>Cetraria aculeata</i> w powiększeniu.....	97
Rys. 6.5. Szkic plechy <i>Cetraria aculeata</i> (...) z układem osi mikrotomograficznych.....	98
Rys. 6.6. Obraz mikrotomograficzny przekroju plechy <i>Cetraria aculeata</i> pochodzącego z jej odcinka górnego	99
Rys. 6.7. Mikrotomograficzny obraz przekroju poprzecznego odgałęzienia plechy <i>Cetraria aculeata</i>	100
Rys. 6.8. Obraz mikrotomograficzny przekroju poprzecznego odcinka górnego plechy <i>Cetraria aculeata</i>	101
Rys. 7.1. Średnia aktywność fotosyntetyczna fotobiontu <i>Cetraria aculeata</i>	103
Rys. 7.2. Zmiany aktywności fotosyntetycznej fotobiontu grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	104
Rys. 8.1. Żywotność komórek komponentu fotobiontycznego grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	106
Rys. 9.1. Dehydratacja do fazy gazowej ($p/p_0 = h = 0\%$) żywej plechy <i>Cetraria aculeata</i>	109
Rys. 9.2. Kinetyka hydratacji żywej plechy <i>Cetraria aculeata</i> prowadzona z fazy gazowej dla różnych wilgotności względnych otoczenia.....	110
Rys. 9.3. Kinetyki hydratacji z fazy gazowej dla martwych plech grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	111
Rys. 9.4. Izoterma sorpcyjna dla plechy <i>Cetraria aculeata</i>	114
Rys. 9.5. Izoterma sorpcyjna w formie parabolicznej dla plechy <i>Cetraria aculeata</i>	114
Rys. 9.6. Izoterma sorpcyjna skonstruowana dla martwych plech grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	117
Rys. 9.7. Sygnały zarejestrowane po sekwencji <i>solid-echo</i> dla plech <i>Cetraria aculeata</i> ..	120
Rys. 9.8. Sygnał zaniku swobodnej precesji dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	121
Rys. 9.9. Zależność parametru <i>a</i> funkcji Abragama od poziomu uwodnienia plech <i>Cetraria aculeata</i>	122
Rys. 9.10. Czasy relaksacji spinowo-spinowej składowych funkcji FID zmierzone	

dla plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i> w zależności od uwodnienia $\Delta m/m_0$	124
Rys. 9.11. Hydratacyjna zależność amplitud składowych cieczowych sygnału MRJ wyrażonych w jednostkach amplitudy ciała stałego dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	124
Rys. 9.12. Łączone dopasowanie hydratacyjnych zależności frakcji wody ściśle związanej (...) oraz całkowitej puli wody	127
Rys. 9.13. Wartość parametru a w funkcji Abragama dla badanych próbek w zależności od poziomu ich uwodnienia [dla plech martwych].....	129
Rys. 9.14. Hydratacyjna zależność czasów relaksacji poprzecznej składowych sygnału FID [dla plech martwych]	129
Rys. 9.15. Hydratacyjna zależność całkowitej amplitudy sygnału cieczowego L/S oraz składowej krótkoczasowej L_1/S (...) dla martwych plech grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	131
Rys. 9.16. Widmo ^1H -MRJ plechy <i>Cetraria aculeata</i>	132
Rys. 9.17. Szerokości połówkowe obu linii składowych widma ^1H -MRJ dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	133
Rys. 9.18. Hydratacyjna zależność sygnału cieczowego MRJ plechy <i>Cetraria aculeata</i> ..	134
Rys. 9.19. Położenia linii Gaussa i Lorentza w zależności od poziomu uwodnienia plechy <i>Cetraria aculeata</i>	135
Rys. 9.20. Różnica między położeniami środków linii Gaussa i Lorentza w zależności od poziomu uwodnienia plechy <i>Cetraria aculeata</i>	135
Rys. 9.21. Hydratacyjna zależność szerokości połówkowej krzywej Gaussa oraz (...) krzywej Lorentza dla martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	136
Rys. 9.22. Hydratacyjna zależność sygnału cieczowego ^1H -MRJ dla martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	137
Rys. 9.23. Zależność położenia pików Gaussa oraz Lorentza (...) od poziomu hydratacji martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	138
Rys. 10.1. Widma ^1H -MRJ dla odwodnionej plechy <i>Cetraria aculeata</i> zarejestrowane w temperaturze 291 K oraz 271 K.....	140
Rys. 10.2. Zależności temperaturowe szerokości połówkowych pików Gaussa (...) oraz pików Lorentza podczas ochładzania i ogrzewania dla plechy <i>Cetraria aculeata</i>	141

Rys. 10.3. Zależność temperaturowa sygnału MRJ mierzonego w domenie częstości dla plechy <i>Cetraria aculeata</i>	143
Rys. 10.4. Położenia linii ciała stałego (Gaussa) oraz linii cieczowej (Lorentza) w funkcji ochładzania plechy <i>Cetraria aculeata</i>	144
Rys. 10.5. Zależność parametru <i>a</i> funkcji Abragama w funkcji temperatury dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	147
Rys. 10.6. Zależność temperaturowa czasów relaksacji spinowo-spinowej składowej stałej i cieczowej sygnału FID dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	148
Rys. 10.7. Zależność temperaturowa amplitud obu składowych cieczowych sygnału FID oraz sumarycznej składowej cieczowej wyrażonej w jednostkach amplitudy sygnału ciała stałego dla plechy <i>Cetraria aculeata</i>	151
Rys. 11.1. Pomiar kalorymetryczne uwodnionej plechy <i>Cetraria aculeata</i> – wybór tempa zmian temperatury	153
Rys. 11.2. Krzywe kalorymetryczne próbek plech <i>Cetraria aculeata</i> uwodnionych do różnych poziomów.....	154
Rys. 11.3. Temperatury zamarzania oraz topnienia zarejestrowane podczas chłodzenia/ogrzewania plech <i>Cetraria aculeata</i> w zależności od poziomu uwodnienia plech.....	156
Rys. 11.4. Zmiana entalpii przejścia podczas ochładzania oraz ogrzewania uwodnionej <i>Cetraria aculeata</i> w zależności od poziomu uwodnienia plech.....	157
Rys. 12.1. Złożenie widm plech grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i> uzyskanych po sekwencji dwóch impulsów twardych: π oraz $\pi/2$ w zależności od czasu między impulsami.....	159
Rys. 12.2. Zależność pól pod powierzchniami pików Gaussa – pochodzących od protonów ciała stałego oraz Lorentza – pochodzących od protonów cieczowych – od czasu między impulsami π oraz $\pi/2$ dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	160
Rys. 12.3. Widmo ^1H -MRJ plechy <i>Cetraria aculeata</i> poddanych sekwencji impulsów $\pi - 0.2 \text{ ms} - \pi/2$	162
Rys. 12.4. Pola powierzchni pod krzywymi Gaussa oraz Lorentza dla plech <i>Cetraria aculeata</i> poddanych sekwencji impulsowej <i>soft-hard</i>	163
Rys. 12.5. Pola powierzchni pod krzywymi Gaussa oraz Lorentza dla plech <i>Cetraria aculeata</i> poddanych sekwencji impulsowej <i>hard-hard</i>	163

Rys. 13.1. Widmo ^2D -MRJ plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	167
Rys. 13.2. Widmo ^{13}C -MRJ plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	168
Rys. 13.3. Widmo ^{31}P -MRJ plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i>	169

Spis tabel

Tabela 5.1.	Wilgotności względne nad powierzchniami przesyconych roztworów wybranych substancji.....	76
Tabela 9.1.	Porównanie poziomów uwodnienia plechy powietrznie suchej, $\bar{A}_0^h$, oraz czasów hydratacji dla różnych gatunków grzybów zlichenizowanych.....	112
Tabela 9.2.	Równowagowy poziom hydratacji plechy grzyba zlichenizowanego <i>Cetraria aculeata</i> w funkcji wilgotności względnej atmosfery.....	113
Tabela 9.3.	Parametry izotermy sorpcyjnej dopasowanej według modelu Denta i BET dla plechy <i>Cetraria aculeata</i>	115
Tabela 9.4.	Parametry izotermy sorpcyjnej dla wybranych gatunków grzybów zlichenizowanych.....	115
Tabela 9.5	Zestawienie nasyceniowych poziomów hydratacji dla martwych plech <i>Cetraria aculeata</i> zebranych w dzień słoneczny i dzień pochmurny.....	116
Tabela 9.6.	Parametry dopasowania modelu Denta w formie sigmoidalnej oraz w formie parabolicznej dla martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	117
Tabela 9.7.	Zestawienie amplitud składowej stałej sygnału otrzymanych z funkcji swobodnej precesji (FID) oraz w sekwencji <i>solid echo</i>	121
Tabela 9.8.	Stężenia nasycenia, c_s , i gęstość protonowa cukrów i wieloalkoholi występujących w przyrodzie.....	126
Tabela 9.9.	Zawartość wielocukrów i wieloalkoholi w dehydratowanej plesze <i>Cetraria aculeata</i>	127
Tabela 9.10.	Modele użyte do opisu funkcji FID martwych plech <i>Cetraria aculeata</i>	128
Tabela 9.11.	Parametry dopasowania krzywych opisanych równaniami (9.10) i (9.11) do danych doświadczalnych zebranych na Rys. 9.15 i 9.16.....	131
Tabela 9.12	Współczynniki dopasowania prostych funkcji wymiennych do danych przedstawionych na Rys. 9.1.....	137

Tabela 9.13. Parametry dopasowania zależności (6.14) do hydratacyjnych zależności ciekowego sygnału $^1\text{H-MRJ}$ plech zebranych w dzień słoneczny i dzień pochmurny	138
Tabela 12.1. Parametry dopasowania odrostu składowej stałej i ciekowej magnetyzacji dla trzech badanych próbek.....	161
Tabela 12.2. Parametry dopasowania funkcji relaksacji w eksperymencie transferu magnetyzacji dla plech <i>Cetraria aculeata</i>	164