



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Kraków, 2023.07.20.

Zenon Matuszak, dr hab.
Zakład Fizyki Medycznej i Biofizyki
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo -Hutnicza
w Krakowie

Recenzja pracy Pani Pauliny Kijak zatytułowanej „*Badanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wysuszenie antarktycznego grzyba zlichenizowanego Usnea aurantiaco-atra*” wykonanej w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Huberta Harańczyka.

1. Cel pracy:

Celem pracy, jak sugeruje tytuł było zbadanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wysuszenie konkretnego gatunku grzyba antarktycznego *Usnea aurantiaco-atra (Ua-a)*. Grzyb ten należy tzw. grzybów zlichenizowanych (dawniej zwanych porostami). Badany obiekt jest gatunkiem endemicznym, należącym do grzybów zlichenizowanych epilitycznych (Roz.1.4, str.25) . Badany organizm jest endemitem występującym w występującym na terenach Ameryki Południowej i Antarktyki, analizowane egzemplarze pochodzą z Szetlandów Południowych (str.23). Grzyby zlichenizowane należą do organizmów zdolnych do przetrwania w ekstremalnie trudnych warunkach, niskiej wilgotności i w temperaturach poniżej 0^o C. Własności te, jak się przypuszcza są powiązane ze zdolnością tych organizmów do efektywnej de-/ i re-hydratacji, zatem ze specjalnymi własnościami wody wewnątrz-plechowej oraz specyfiką jej gospodarowania przez w/w grzyby. Tematyka ta jest uprawiana w Zakładzie Fizyki Medycznej IF UJ od wielu lat i była przedmiotem wielu publikacji i komunikatów naukowych, w tym wymienionych na str.11 i 12 recenzowanej pracy, a których współautorką jest Doktorantka. Zainteresowanie problematyką eksteremofili roślinie systematycznie, także w obszarze ogólnie pojętej astrobiologii (str. 21-23).

2. Struktura pracy

Prezentowana praca ma klasyczną strukturę. Manuskrypt liczy 106 stron numerowanych, kończy się spisem literatury obejmującym 52 pozycje (str.97-102), spisem ilustracji (str.103-105) i spisem tabel (str.106) . Praca jest napisana w języku polskim. Zawiera w części wstępnej kolejno: (1) streszczenie (str.8) i abstrakt w języku angielskim (str.10) oraz (2) wykaz prac (str. 11) - 6 pozycji, w tym jedna w przygotowaniu; tytuł tej ostatniej wskazuje, że będzie ona poświęcona tematyce opisanej w recenzowanej pracy doktorskiej i (3) -komunikatów naukowych (także 6 pozycji), (str.11-12), Prace i komunikaty dotyczą podobnej tematyki, są pracami wieloautorskimi. Doktorantka jest ich współautorką, udział współautorów nie jest wyspecyfikowany.

Zasadniczą treść pracy kończą rozdziały Dyskusja Wyników (str. 90-94) i Wnioski (str. 95-96).

Recenzja omawia po kolei rozdziały pracy.

Roz. 1. Zasadnicza część pracy rozpoczyna się na stronie 13. Roz. 1 (str.13-26), zatytułowanym „Grzyby zlichenizowane”, w którym Autorka definiuje tę kategorię organizmów symbiotycznych (grzyb i fotobiont - składnik fotosyntetyzujący). Autorka omawia morfologię (wprowadzona jest terminologia botaniczna związana z badanymi obiektami); przedstawia także podstawowe własności tej grupy organizmów istotne z punktu widzenia realizowanej pracy: zdolności adaptacyjne, które umożliwiają kolonizację praktycznie wszystkich ekosystemów naszej planety. W szczególności istotna jest odporność na skrajne warunki środowiskowe - naturalne, gdyż zanieczyszczenia są powodem ich obumierania co skutkuje silnym zubożeniem gatunkowym na terenach uprzemysłowionych. Z punktu widzenia pracy istotna jest, potwierdzona eksperymentalnie (str.18-21 i literatura tam cytowana) odporność na zamarzanie i wysuszenie, przy zachowaniu zdolności metabolicznych, w tym do fotosyntezy.

Zdolności te wymagają wyjaśnienia, istnieją próby opisu mechanizmów, przy pomocy których grzyb chroni plechę przed skutkami zamarzania wody, tworzenia krystalitów, takie jak wydzielanie krioprotektantów (polialkohole, węglowodany), czy substancji żelowych lub prowadzenie stymulowanego wzrostu krystalitów lodu w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych.

Zdolności grzybów zlichenizowanych, do przetrwania w warunkach anabiozy (w tym przypadku anhydrobiozy) związana jest z własnościami higroskopijnymi plechy, po uwodnieniu plecha powraca do normalnego metabolizmu, którego intensywność zależy od stopnia uwodnienia.

Własności te czynią z grzybów zlichenizowanych interesujący obiekt badawczy, w kontekście badań fizykochemicznych i biologicznych: charakterystyki stanów wody, procesów hydratacji i dehydratacji oraz ich konsekwencji biologicznych.

Uwaga_01. W rozdziale wstępnym, zasadniczo dobrze napisanym, według opinii Recenzenta powinny się pojawić informacje o kluczowych własnościach wody (w postaci osobnego krótkiego podrozdziału), cieczy wyjątkowej, albowiem problemy hydratacyjne są podstawowe dla recenzowanej pracy. Rozdział taki bardzo wzmocniłby wewnętrzną spójność narracji. W szczególności uwagi dotyczące roli wody związanej (redukcja stopni swobody ruchu molekuł H₂O i swobodnej oraz podatność tych dwu rodzajów wody na zamarzanie.

Ocena takich stanów H₂O wymaga opracowania właściwej metodyki badawczej a następnie oceny na ile stosowane metody i interpretacja wyników pozwalają na realizację celu (-ów) pracy.

Roz.2. Metodom badawczym użytym w pracy poświęcono Rozdział 2 (str.27-53), zatytułowany „Metody Badawcze”.

Pierwszą omawianą metodą jest spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (NMR), jedna z dwu podstawowych metod badawczych stosowanych w pracy (Roz. 2.1, str. 27-48). Jej podstawy teoretyczne w ujęciu podano w ujęciu półklasycznym (str.27-34) ; prezentację zakończono demonstracją równań Blocha (wzory 29,30,31 , str.36). Rozdział jest kontynuowany (Roz.2.1.3, str.36-37) , omówieniem procesów relaksacyjnych; wymieniono mechanizmy relaksacji jądrowej (Roz.2.1.3) pokazano wyrażenia opisujące oddziaływanie dipolowe (str.37, nagle pojawiają się operatory spinowe I⁺, I⁻) oraz w podrozdziale następnym 2.1.4 wyrażenia na czasy korelacji w ujęciu teorii BPP (Bloembergen, Purcell, Pound) (str.38-40).

W rozdziałach tych brak jest cytowanej literatury, poza wspomnieniem w opisie Tabeli 1 (str.28, skądinąd z błędną datą publikacji). Omawiany rozdział zasadniczo ma charakter podręcznikowy i jak sądzę prezentowany rozdział opiera się o dwie pozycje wymieniane w spisie literatury jako [24,25] ale nie są one cytowane. Prezentowana teoria jest opracowana poprawnie. Strona redakcyjna pozostawia sporo do życzenia, opis sprawia wrażenie niekompletnego i napisanego w pośpiechu bez niezbędnej kontroli. Np. wyrażenia na szybkości relaksacji spin -sieć (1/T₁) (36, str.38) i spin-spin (1/T₂) (37, str.38) nie są opisane, symbole użyte nie są objaśnione.

Rozdział następny (2.1.5, str.40-44), istotny z punktu widzenia analizy i interpretacji eksperymentu wprowadza pojęcia kształtu linii NMR (Lorenz, Gauss, Abragam) i ich związku z charakterem ruchu molekularnego. Opisano charakter sygnału NMR w domenie czasu FID (sygnał swobodnej precesji-Free Induction Decay), bez wprowadzania jej definicji; oraz przejście do domeny częstotliwościowej. Pojawiają się wyrażenia dla próbek ciekłych (eksponenta i funkcja Lorentza) i stałych (FID w postaci funkcji Abragama i jej transformaty Fouriera (wzory 45, 46, str. 41 oraz 47, 48 str. 42; a nawet rozwinięcie FID w szereg momentów statystycznych (wzór 50, str. 43). Oraz dodatkowo komentarz o ilorazie M_2^2/M_4 z uzasadnieniem, że model Gaussa można stosować do próbek porostów (powołanie na wyniki z wcześniejszych eksperymentów (str.43).

Uwaga_02. Przedstawiony opis jest bardzo ogólny, zasadniczo poprawny, zawiera niezbędne informacje o charakterze encyklopedycznym. Wymieniane wyrażenia są znane, w spisie literatury pojawia się fundamentalna monografia Abragama pod numerem 1, ale nie jest cytowana. Cytat pojawia się tylko w komentarzu do ilorazu momentów M_4/M_2^2 . (Generalnie także w tym rozdziale brak odniesień literaturowych).

Uwaga_03. Zdaniem Recenzenta kolejność rozdziałów winna być odwrotna. Roz. 2.1.6 (str.44-46), w którym wprowadzono opis metody impulsowej rejestracji sygnału NMR, a taki sposób rejestracji sygnału używany jest w pracy) oraz FID wraz z definicją tej wielkości i przejście do domeny częstotliwościowej przez transformatę Fouriera winien poprzedzać Roz. 2.1.5. Od metody do analizy i opisu wyniku.

Szczególnie, że w rozdziale następnym zatytułowanym „Zależności hydratacyjne sygnału ^1H NMR” (2.1.7, str. 46) pojawiają się formuły wiążące zjawiska adsorpcji wody i sygnału ^1H NMR, kluczowe dla interpretacji pomiarów NMR-owskich. Albowiem Autorka stwierdza (str.46) „*że dla próbek, w których zachodzi zjawisko adsorpcji molekuł do powierzchni zależność hydratacyjna stosunku składowej cieczowej L (w terminologii stosowanej w pracy) do składowej stałej S zmienia się liniowo w funkcji hydratacji*”. Opisują to formuły (55), (56), (57), (58), (59) (str.46-47), a te z kolei odwołują się do pracy, której nie ma w spisie literatury (Harańczyk et al., 1999).

Recenzent odnalazł wprawdzie tę pracę (Holzforschung, 53, 1999, 299-310) i zapoznał się z jej wynikami oraz innymi pracami o podobnym charakterze, w których do opracowania wyników zależności hydratacyjnej sygnału ^1H NMR użyto wzorów o identycznej postaci. Konkluzja po dokonaniu takich studiów byłaby następująca: stosunek sygnału cieczowego (L) do sygnału stałego (S) jest uznany za miarę ilości wody związanej w próbce czyli w terminologii Autorki (Autorów) $\Delta m/m_0$ (formuła 58, str.47). Formuły, od 55 do 59 opisano prawidłowo.

Następny Rozdział 2.2 (str. 48-52) „Adsorpcja. Modele izotermy sorpcyjnej” omawia procesy adsorpcji. Także ten fragment teoretycznej części pracy jest kluczowy dla interpretacji wyników, albowiem w pracy badane są procesy adsorpcji wody na wybranych grzybach zlichenizowanych.

Adsorpcja to ogólnie gromadzenie się określonej substancji na powierzchni granicznej dwu faz. W pracy adsorpcja na badanych grzybach (plecha, zarodniki, łodyżki) ma miejsce z fazy gazowej. Badanie procesów adsorpcyjnych, a szczególnie adsorpcji wody w układach biologicznych, począwszy od najprostszych, molekularnych np. białka, kwasy nukleinowe itd., poprzez struktury komórkowe i tkankowe ma długą historię i bogata literaturę, z dużym udziałem metod rezonansu magnetycznego (NMR) i metod klasycznych, termodynamicznych. Zastosowania analizy procesów adsorpcyjnych obejmują zakres od chemii budowlanej poprzez przemysł spożywczy, drzewny do zastosowań specjalistycznych, wszędzie tam, gdzie następuje kontakt faz. Temat jest zatem ważny ogólnie.

W Roz. 2.2 Autorka omawia zjawisko adsorpcji fizycznej oraz modele izoterm adsorpcyjnych użyte w pracy do interpretacji wyników. Rozdział jest skrótowy, problemy i ogólna terminologia termodynamiczna stosowana do opisu procesów adsorpcyjnych nie są wspomniane pomimo istnienia podręczników z tego zakresu w tym także w języku polskim. Jeden jest wymieniony w pracy (Z. Sarbat, pozycja 47 w spisie literatury). Autorka poprawnie omawia 3 izotermy Langmuira (L), BET

(Brunauer, Emmett, Teller) oraz izotermę GAB (Guggenheim, Anderson, de Boer)-Dent. Formuły dla tych izoterm (wzory 60, 61,64; str. 51 i 52) wraz z ich transformacjami do postaci parabolicznych dla izoterm BET i GAB-Denta podane są w specyficznych postaciach zależności $\Delta m/m_0$, względnego przyrostu masy wody zaadsorbowanej do suchej masy jako funkcji wilgotności i parametrów danej izoterm (wzór 60 i następne). Jest to uwarunkowane metodyką eksperymentu (rozdziały dalsze, w których te formuły w /w postaci są używane). Formuły w w/w postaci **wymagają objaśnienia**. Teorie (L), BET lub GAB-Dent operują pojęciami miejsc aktywnych, na których dokonuje się jedno-lub wielowarstwowa adsorpcja i na powierzchniach **płaskich**. Jak rozumiem we wzorach na izotermie Δm jest powiązana ze średnią liczbą wszystkich zaadsorbowanych molekuł relacją proporcjonalności, natomiast ΔM jest masą wody, która wysyciłaby wszystkie dostępne w danych warunkach miejsca wiążące (pojemność adsorpcyjną). Kwestia ta domaga się głębszej dyskusji i komentarza.

Uwaga_04. (a) Wielkość a_w (str.49) jest niedefiniowana „wilgotność względna wyrażona ułamkiem” - jakim?, jak sędzę p/p_0 ?

(b) W formule na izotermę Denta, współczynniki C_0 oraz C (wzór 64 i objaśnienia poniżej) nie zostały zdefiniowane, współczynnik a w ogóle w formule nie występuje.

(c) Rys. 8 (str.51), na osi odciętych parametr h nie został opisany (domyślnie to humidity ?, ale należało podać związek z parametrem a_w , występujący h we wzorach na izotermie adsorpcji); są to wielkości tożsame ale inaczej oznaczone, czy też naprawdę a_w to aktywność wody (water activity)? Aktywność wody jest równa względnej równowagowej wilgotności ERH (%) (ERH- Equilibrium Relative Humidity) dzielonej przez 100 ($a_w = ERH/100$).

(d) Z kolei izotermie adsorpcji na tym rysunku (Rys. 8., str.51), zostały, jak sędzę, uzyskane w wyniku symulacji izoterm L, BET i GAB-Dent przy założeniu pewnych wartości parametrów symulacyjnych, parametry te nie zostały podane, a powinny.

W rozdziale 2.3 „Kinetyka adsorpcji” opisujący przyjętą jedno-ekspotencjalną formułę dla opisu kinetyki adsorpcji

Rozdział 2.4. „Skaningowa kalorymetria różnicowa DSC” (str.52-53)

Opis obejmuje podstawy metody DSC (DSC-Differential Scanning Calorimetry) i jest recepcją pozycji [51] w spisie literatury.

Podsumowanie Rozdziału: Opis metod teoretycznych jest fragmentaryczny, ma charakter recepcyjny i wymaga od Recenzenta studiowania literatury oryginalnej, przeliczania formuł, badania zasadności założeń. Szczególnie, że cały Rozdział nie posiada sensownych odnośników literaturowych; z przeprowadzonych studiów Recenzent wie, że formuły były używane w pracach oryginalnych, w tym także w tych pracach, których Doktorantka jest współautorką ale takie odnośniki winny się pojawić.

Roz.3 Materiały i metody, przygotowanie próbek

Podrozdział 3.1” Przygotowanie próbek”

Uwaga_01. Metodyka, próbki pochodziły z zielnika Instytutu Botaniki UJ, wilgotność względna przechowywania 30%. Suchą masę (nie wiadomo ile wynosiła dla każdego rodzaju próbek) oznaczono w wagosuszarce RADWAG MA60.3Y(temperatura 70^o C). Wyznaczono wilgotność względną. Pomiary adsorpcji (poprzez pomiar zmian masy wagą RADWAG WAX 110) dokonywano klasyczną metodą grawimetryczną (EMC-Equilibrium Moisture Content), parametry czasowe dobierano doświadczalnie wilgotności względne oznaczano metodą eksykatorową.

Uwaga_05. Próbki plechy rozdrabniano (str.55), czy owocniki lub łodyżki także, badano także fragmenty całej plechy. Jakie były masy tych obiektów użyte w doświadczeniach?

Uwaga_06. W tabeli wilgotności względnych nie podano źródeł literaturowych lub norm europejskich (IUPAC), normy takie istnieją dla poszczególnych nasyconych roztworów soli a roztwory były sporządzane, jak mam nadzieję, zgodnie z ich wytycznymi (wskazują na to roztwory użytych soli).

Stosowana metodyka jest zasadniczo poprawna wymaga jednak dodatkowych komentarzy uzupełniających, szczególnie istotnych z punktu widzenia podrozdziału 3.2 „Spektroskopia ^1H NMR” (str.55-56) i 3.3 „ Relaksometria ^1H NMR”. Sposoby uwadniania próbek do warunków pomiarowych spektroskopii NMR realizowanych różnymi aparatami (str. 55, rejestracja widm i str.56 relaksometria) były podobne, metodą eksykatorową. Jakie dobierano masy próbek, rozmaitego rodzaju (plechy, owocniki, łodyżki- współczynnik wypełnienia) albowiem stosowano różne metody pomiarowe do rejestracji widm NMR próbek o różnym stopniu uwodnienia, wyznaczania czasów T_1 (IR-Inversion Recovery), T_2 , kinetyki itd.

Podano parametry doświadczeń NMR zarówno dla pomiarów spektroskopowych (spektrometr Bruker Biospin $B_0=7\text{T}$, impulsy $\pi/2$), jak też relaksometrycznych (spektrometr WNS HB65, 0.7 T, impulsy $\pi/2$), jak też sposoby traktowania danych eksperymentalnych celu obliczenia optymalnych parametrów dopasowania (algorytm Levenberga-Marquardta (str.56), w oprogramowaniu OriginLab i programie CracSpin).

Podsumowanie metodyki: metodyka została przedstawiona w sposób poprawny, ale nie do końca precyzyjny, uwagi zamieszczono powyżej.

Rozdział 4. Wyniki

Podrozdział 4.1 Kinetyka hydratacji

Próbki hydratowano z fazy gazowej. Okazało się (metoda dopasowania do funkcji eksponencjalnej lub ich superpozycji), że dla niskich stopni wilgotności uzyskano kinetykę jedno-eksponencjalną dla średnich (powyżej 88% wilgotności dwu-eksponencjalną dla wszytkich trzech rodzajów próbek usne aurantiaco- atra tzn. łodyżek plechy, owocników oraz próbek całej plechy. Rys.10,11,12, Tabela 3 i 4 pokazują wartości parametrów dopasowania do w/w przebiegów jedno- i dwu -eksponencjalnego (str.58-62), przy różnym dla każdej próbki poziomie hydratacji przy wilgotności 0%.

Autorka interpretuje wyniki w wskazując, że są za te przebiegi odpowiedzialne różne frakcje wody silnie, ściśle i luźno związana. Dla każdej ze składowych utożsamiono współczynniki przedeksponencjane A_i w odpowiednich eksponentach z poziomem nasyceniowym danej frakcji zaadsorbowanej wody, a to z kolei po zsumowaniu daje całkowite stopień hydratacji dla ustalonej wilgotności. W każdym z badanych przypadków obserwowany jest szybki wzrost hydratacji całkowitej po przekroczeniu pewnego poziomu wilgotności względnej, różnej dla różnych próbek. Jest to interesująca obserwacja wymagająca objaśnienia. Otrzymane wartości są porównywane z wynikami uzyskanymi dla innych gatunków grzybów, we wcześniejszych eksperymentach.

Podrozdział 4.2. Izotermy adsorpcji

Konstrukcja izotermy sorpcyjnej jest opisana bardzo krótko. Zsumowano wartości współczynników A_i otrzymane dla każdej z wartości wilgotności względnej (przydałby się tabelka). Wyniki pokazano w postaci dopasowania do izoterm BET i GAB-Denta (Rys 13, str. 63-64, uwaga t[h] to po prostu h?) argumentując, że uzyskano „sigmoidalny kształt izotermy adsorpcji”, a tego typu postać izotermy zwykle dobrze odwzorowuje zjawisko adsorpcji wielowarstwowej”.

Obliczenia parametrów b oraz b_1 w modelu GAB-Denta dla badanych próbek (łodyżki, owocniki, plecha) (Tabela 5. Str. 65) oraz Rys. (nienumerowany str.65 ?, Rys.15. str.66), na których pokazano dopasowania izoterm BET i GAB-Dent w postaci parabolicznej, sugerują, aczkolwiek w mojej opinii nie do końca przekonują, że model GAB-Dent lepiej oddaje proces hydratacji z fazy gazowej, dla rozważanych procesów adsorpcyjnych w przypadkach izolowanych fragmentów plech, owocników i całych plech (Rys.14, str.63-64, Rys.15. str. 65-66) . Pokazane rysunki i wyniki dopasowania wniosek taki sugerują.

Podrozdział 4.3 Zależności hydratacyjne widm ^1H NMR

Pomiary spektroskopowe plech wykonano w całym zakresie uwodnień z fazy gazowej (str.67). W pracy pokazano przykładowe widma (Rys. 16 , str.67-68,) wraz z dopasowaniem funkcji reprezentującej

składową stałą A_S (w postaci funkcji Gaussa) i cieczową A_L (funkcja Lorentza) (wzór 72, str.67). Dokonano zatem dekompozycji widma na dwie składowe. Widoczny jest zanik składowej stałej ze wzrostem poziomu uwodnienia, co zostało pokazane (str.69) poprzez wyliczenie szerokości linii Gaussa i Lorentza jako funkcji stopnia uwodnienia (Rys.17. str.69), zidentyfikowano zwężenie linii Lorentza ze wzrostem stopnia uwodnienia (linia gaussowska także zwęża się nieznacznie), podano obliczony średni czas relaksacji spin-spin $T^*_{2s} \approx 10.4 \mu s$ (wzór 73); oraz zinterpretowano różnicę z pomiarami relaksometrycznymi, które pojawiają się dopiero na stronie 77, jako możliwy efekt aparaturowy. Wykreślono także zależność sygnału cieczowego (lorenzowski) w jednostkach sygnału stałego (gaussowski); otrzymano zależność nieliniową, która dopasowano funkcją wymierną (wzór 58, str.47).

Uwaga_07. Rysunki w tekście są błędnie ponumerowane zamiast 15 winno być 16, zamiast 17, winno być 18. Na rysunkach zdaniem recenzenta powinny się pojawić parametry dopasowania np. A_L , A_S itd., ułatwiłoby to czytanie tekstu

4.4 Zależności temperaturowe widm 1H NMR.

Wyniki obejmują dwie sekwencje pomiarowe dla różnych poziomów uwodnienia (67% i 9 %) w zakresie temperatur 215 -295 K. Mierzono plechę. Wyniki analizowano przy pomocy superpozycji funkcji Gaussa i Lorentza (Rys.20, str.73). Zaobserwowano wzrost szerokości połówkowej linii gaussowskiej oraz lorenzowskiej (Rys.21, str.74), co jest zjawiskiem naturalnym związanym ze zmianą ruchliwości protonów przy obniżaniu temperatury dla obu poziomów hydratacji. Dla niskiego stopnia uwodnienia stosunek sygnałów S_L/S_G jest łagodny, monotoniczny, „ co może zdaniem Autorki świadczyć o niekooperatywnym unieruchomieniu cząsteczek wody (Rys.22, str.75), natomiast dla wyższych stopni uwodnienia (Rys.23, str.76) obserwowany jest skok, za który prawdopodobnie odpowiada proces krystalizacji.

Uwaga_08. Czy w pomiarach położenia linii gaussowskiej i lorenzowskiej (Rys.24, str.76) był używany jakiś standard?

Podrozdział 4.5 Pomiary relaksacyjne. Wyniki relaksometrii 1H NMR

Pomiary relaksometryczne (rejestrowano sygnały FID) w temperaturze pokojowej w pełnym zakresie uwodnień, pomiary przeprowadzono dla dwu różnych próbek *Usnea aurantico-atra*, oznaczonych jako I (Rys.25, str.77) oraz II (Rys.26, str.78) oraz Rys.27, str. 79), na którym pokazano sygnały FID przy różnych poziomach uwodnienia próbki, z występującym tzw. beat pattern dla niskich poziomów uwodnienia. Kształtowi „beat pattern” przepisano obecność układu fazy szklistej. Używano 3 różnych funkcji do dopasowania danych doświadczalnych zależności od poziomu uwodnienia, Abrahama (składowa stała) i jedno-eksponcjinalną dla składowej mobilnej (wzór 75. Str.80) dla niskich poziomów uwodnienia oraz dwie składowe eksponencjalne i funkcję Gaussa (dla składowej stałej) dla poziomów uwodnienia wyższych (wzór 76, str.76). Procedury dopasowania pozwoliły na wyznaczenie parametru a w funkcji Abrahama (str.78) i czasów relaksacji T^*_2 (Rys.28, str.81) dla składowej stałej i zidentyfikowanych dwu składowych od protonów mobilnych. Stwierdzono, że T^*_{2s} praktycznie się nie zmienia ze stopniem uwodnienia i wykreślono w oparciu o formuły (58 i 59, błędnie podano numery 68 i 69) L_1/L oraz $(L_1+L_2=L)/S$ wyliczając parametry dopasowania (Rys. 29, str. 82) oraz wartość stężenia nasyceniowego rozpuszczalnej frakcji stałej.

Zasadność użycia krzywej Gaussa wsparto obliczeniem drugiego (M_2) i czwartego (M_4), str.83 momentu stałej składowej FID (obliczeń nie pokazano, brak także odnośnika literaturowego np. monografii Abrahama), natomiast wykresy wartości M_2 i M_4 w funkcji stopnia uwodnienia (Rys. 30 i 31, str.83, w tekście odniesienie jest nieprawidłowe jako Rys. 29,30) sugerują wzrost mobilności frakcji stałej plechy a stosunek M^4/M_2^2 jest bliski 3, zatem sygnał jest faktycznie w przybliżeniu gaussowski. Podrozdział 4.6. Czas relaksacji spinowo-sieciowej T_1 . Pomiar przeprowadzono w metodą IR (IIR - Inversion Recovery), dla zdehydratowanych próbek w przedziale temperatur 295 do 215 K i w funkcji odstępów pomiędzy impulsami π i $\pi/2$ (Rys.32, str.84), identyfikując dwie składowe gaussowską

(protony o ograniczonej mobilności) i lorenzowska (protony mobilne, analiza w ramach modelu dwueksponencyjnego (Rys.33). Autorka nie podaje wartości amplitud A_S i A_L . Opis nie jest do końca jasny; czy dla każdej gaussowskiej i lorenzowskiej części zidentyfikowano tylko jedną składową dla każdej? Na Rys.32 są widoczne dla plechy suchej dwie składowe widma.

Końcowym efektem jest wyznaczenie energii aktywacji dla relaksacji spinowo -sietciowej dla dwu zidentyfikowanych składowych czasu relaksacji T_1 na podstawie formuły typu Arrheniusa (Rys.34, str.86).

4.7 Eksperymenty inkubacyjne DSC

Badania DSC prowadzone na nieco innych organizmach, ale z podobnego siedliska. Po schłodzeniu do temperatury -60°C , ogrzewano do -20°C i rejestrowano termogramy dla plechy *T. complicatum* (Rys. 35a i b. str. 87, w tekście błędne odniesienie do Rys. 34 a, b) i *Cetraria aculeata* (odniesienie w opisie jest do pracy z roku 2018 a nie jak wskazano w pracy 2019). Zaobserwowano silną asymetrię pików DSC po okresie inkubacji (2 godz.) w niskiej temperaturze. Asymetria pików DSC wiązana jest z obecnością wody w komórkach fotobionta lub też obecnością kompartmentów, o obniżonej temperaturze topnienia lodu? (Autorka chyba omyłkowo napisała topnienia wody) (str.89). *Uwaga_09*. Autorka twierdzi, że " Krzywe zostały rozłożone na dwie składowe tj. Symetryczną część główną i pik niskotemperaturowy. Zależności hydratacyjne obszaru pod głównym pikiem i pod pikiem niskotemperaturowym miały postać liniową". Brak jest jakiegokolwiek odniesienia. Recenzent odnalazł pracę (cytowanie w pracy w opisie rysunku faktycznie w tej pracy z *Polar Biology* podobne wykresy się pojawiają).

Uwaga ogólna w spisie literatury jest o wiele więcej pozycji aniżeli pozycji cytowanych w tekście. Autorka nie powołuje się na nie w miejscach, w których to powołanie winno wystąpić.

Roz.5 Dyskusja wyników (Str. 90-94) i **Roz. 6**. Wnioski (str.95-96)

Rozdział 5 jest podsumowaniem i recepcją informacji zawartych we wcześniejszych rozdziałach pracy i takie też tytuły mają nienumerowane podrozdziały np. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej (str90-91) czy Izoterma sorpcyjna (str.91-92) itd.. Wartości parametrów są porównywane do ich wartości uzyskanych dla innych typów porostów, uzyskanych w podobnych typach eksperymentów.

Analogiczny charakter ma także następny Rozdział 6.. Rozdziały te są podsumowaniem wyników i nieco ułatwiają poruszanie się po całym tekście i porządkowanie informacji oraz końcową pozytywną ocenę całości.

Komentarze końcowe:

1. Brak jest komentarzy na temat części numerycznej, istotnej dla uzyskanych parametrów i dyskusji, porównań z innymi grzybami zlichenizowanymi. Autorka podaje tylko wyniki dopasowania oraz obliczone parametry. Patrząc na dość złożoną strukturę wyrażeń używanych w procedurach dopasowania trudno uniknąć problemów. Metody optymalizacyjne są metodami iteracyjnymi i znalezienie dopasowania np. dwu lub trzech eksponent jest procedurą należącą do tzw. problemów źle uwarunkowanych. Trudno określić, kiedy się kończy jedna krzywa a zaczyna następna.
2. Dane doświadczalne dla izoterm były analizowane tylko dla 3 ich rodzajów, praktycznie dwóch BET i GAB-Dent. Skąd to ograniczenie? Czy próbowano (w recenzowanej pracy i w innych pracach dotyczących tej tematyki nie znalazłem takich prób). Wzmocniłoby to proces analizy i pogłębiło znajomość fizyki problemu. Znanych jest ponad 100 izoterm, o różnej ilości parametrów a kilkanaście z nich daje się sprowadzić do postaci parabolicznej.
3. Czy próbki plechy były żywe, czy martwe, czy prowadzono na próbkach najprostsze testy przeżyciowe np. z błękitem metylenowym?

4. Zgadzam się, że występowanie wody w dwu (może trzech?) stanach można uznać za wniosek dobrze udokumentowany wynikami eksperymentów.
5. Interpretacja pomiarów NMR -owskich zakłada tak naprawdę kontakt dwu jednorodnych (płaskich powierzchni) o różnym „stanie wody” i z takiego założenia wynika cała metodyka i wybór sposobu interpretacji, związek z realną sytuacją,, morfologią próbek jest raczej teoretyczny?
6. Podano w pracy wiele interesujących obserwacji, spostrzeżeń, interpretowanych dość jednostronnie, brak jest odniesień postulowanych mechanizmów do badań na prostszych układach, na których zademonstrowano jasno takie właśnie zachowanie.
7. Nawiązania do związków pomiędzy konkretnymi wynikami pomiarów a ich relacją do mechanizmów obronnych mają charakter dość przypadkowy, pojawiają się w różnych miejscach np. str. 78., podsumowanie i bardziej systematyczne ujęcie pojawia się dopiero w Rozdziałach 5,6.
8. Izotermy są bardzo często stosowane w celu zrozumienia oddziaływania wody (lub innych czynników) z badanymi materiałami. Izotermy użyte w pracy należą do najbardziej popularnych i opierają się na wyidealizowanych założeniach fizycznych. Ale służą, także w pracy, do określenia pewnych własności np. pojemności jednowarstwowej, która z kolei definiuje ilość miejsc sorpcyjnych dostępnych w danym materiale dla danych warunków). Sformułowanie takie jest jednak równoważne stwierdzeniu, że ten wyidealizowany model odzwierciedla rzeczywiste oddziaływanie np. w naszym przypadku plecha-woda.
9. Modele używanych izoterm mogą i są zredukowane do tzw. postaci parabolicznej (a_w/EMC) i na ich podstawie są wyliczane i interpretowane własności fizyczne badanego obiektu. Zwyczajowo modele te dobrze się dopasowują do danych eksperymentalnych, stąd też zapewne bierze się ich popularność (takich modeli, parabolicznych jest kilkanaście). Samo dopasowanie nie jest równoznaczne z rzeczywistą fizyką problemu.
10. To czego brakuje Recenzentowi to obliczenia wielkości termodynamicznych, które charakteryzują badane układy, a które z izoterm i danych NMR można uzyskać (?). Mogą służyć jako wielkości fizyczne do analizy porównawczej wielu organizmów, między innymi grzybów zlichenizowanych badanych w ciągu wielu lat w Zespole. Np. równanie BET można zapisać w postaci liniowej a formuła w tej postaci służy do wyznaczania powierzchni właściwej adsorbentu i jest metodą klasyczną. Może to być wskazówką w dalszych badaniach.

Uwagi końcowe.

1. Praca ma charakter czysto doświadczalny. Merytorycznie zaprezentowane podejście jest systematyczne a wykonane pomiary termodynamiczne i NMR-wskie wzajemnie się uzupełniają. W wykonanie eksperymentów i ich opracowanie włożono mnóstwo dobrze wykonanej pracy; szkoda, że nie zostało to w wielu przypadkach w sposób przekonywujący pokazane i uzasadnione w prezentowanym tekście.
2. Lektura pracy jest trudna, wymaga od czytelnika dodatkowej lektury i analizy, język jest często schematyczny, ogólnie redakcja pracy jest niedopracowana, wiele elementów jest prezentowanych bardzo pobieżnie i obniża wai tość odbioru pracy jako całości. Recenzent ma nieodparte wrażenie, że nie doszło do krytycznego przeglądu ostatecznej wersji pracy i stąd uchybienia (wskazane między innymi w recenzji); może z powodu braku czasu. Mam nadzieję, że Doktorantka ustosunkuje się do komentarzy i uwag zawartych w recenzji.

3. Stwierdzam jednocześnie, że zawartość pracy i współautorstwo Autorki w pracach cytowanych (str. 11), świadczy, że Doktorantka opanowała podstawy teoretyczne analizowanych zjawisk, stosowanych w pracy metod badawczych oraz wykazała się umiejętnością ich praktycznego zastosowania do rozwiązania postawionego w tytule pracy problemu badawczego,

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Pauliny Kijak zatytułowana „Badanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wysuszenie antarktycznego grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra*” spełnia kryteria stawiane kandydatom zwarte w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018. poz. 1668, art.187) i wnoszę o dopuszczenie mgr Pauliny Kijak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Zenon Matuszak