

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Paulina Agnieszka Kijak

Nr albumu 1068469

**Badanie molekularnych mechanizmów
odporności na przemarzanie i wysuszenie
antarktycznego grzyba zlichenizowanego
*Usnea aurantiaco-atra***

Praca na stopień doktora nauk fizycznych

wykonana pod kierunkiem

Prof. dr. hab. Huberta Harańczyka

w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki UJ

Kraków 2023

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana Paulina Kijak (nr indeksu: 1068469) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „*Badanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wyszukanie grzyba zlichenizowanego Usnea aurantiaco-atra*” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem prof. Huberta Harańczyka. Pracę napisałam 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 świadoma, 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

.....

podpis doktorantki/doktoranta

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Panu Profesorowi dr. hab. Hubertowi Harańczykowi
za wszechstronną pomoc i wsparcie, dyskusje naukowe, poświęcony czas
oraz przekazaną wiedzę.

Kieruję podziękowania do Pani Prof. dr hab. Marii Olech
za dostarczenie próbek porostów oraz udostępnienie materiałów naukowych.

Serdecznie dziękuję Panu inż. Tomaszowi Malarzowi
za niezawodną pomoc w obsłudze spektrometrów.

Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizyki Medycznej
w szczególności Panu dr. Karolowi Kubatowi
za pomoc w wykonaniu i opracowaniu pomiarów.

Pani Prof. dr hab. Monice Marzec za możliwość przeprowadzenia
pomiarów kalorymetrycznych i udzieloną pomoc,

Panu dr. Jakubowi Fitasowi za pomoc w przeprowadzeniu pomiarów
kalorymetrycznych i poświęcony czas,

Przede wszystkim dziękuję mojej Rodzinie i Przyjaciółom.

SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	8
Abstract.....	10
1. GRZYBY ZLICHENIZOWANE	
1.1 Grzyby zlichenizowane – charakterystyka ogólna.....	13
1.2 Odporność na skrajne warunki środowiska.....	17
1.3 Grzyby zlichenizowane w kontekście astrobiologicznym.....	21
1.4 Charakterystyka badanych organizmów	23
2. METODY BADAWCZE	
2.1 Elementy teorii magnetycznego rezonansu jądrowego.....	27
2.1.1 Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego w ujęciu półklasycznym.....	31
2.1.2 Zjawiska relaksacji.....	34
2.1.3 Mechanizmy relaksacji jądrowej.....	36
2.1.4 Czas korelacji.....	38
2.1.5 Kształt linii rezonansowej w spektroskopii NMR.....	40
2.1.6 Impulsowe metody NMR. Sygnał swobodnej precesji FID.....	44
2.1.7 Zależność hydratacyjna sygnału ^1H NMR.....	46

2.2 Adsorpcja. Modele izotermy sorpcyjnej.....	48
2.3 Kinetyka hydratacji.....	52
2.4 Skaningowa kalorymetria różnicowa DSC.....	52
 3. MATERIAŁY I METODY	
3.1 Przygotowanie próbek.....	54
3.2 Spektroskopia ^1H -NMR.....	55
3.3 Relaksometria ^1H -NMR.....	56
 4. WYNIKI	
4.1 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej.....	57
4.2 Izoterma sorpcyjna.....	63
4.3 Zależności hydratacyjne widm ^1H -NMR.....	67
4.4 Zależności temperaturowe widm ^1H -NMR.....	72
4.5 Wyniki relaksometrii ^1H -NMR.....	77
4.6 Czas relaksacji spinowo-sieciowej T_1 w spektroskopii ^1H -NMR.....	83
4.7 Eksperymenty inkubacyjne DSC.....	87
 5. Dyskusja wyników.....	90
6. Wnioski.....	95
7. Bibliografia.....	97
SPIS TABEL.....	102
SPIS RYSUNKÓW.....	105

Streszczenie

Grzyby zlichenizowane odgrywają dominującą rolę w ekosystemie Antarktyki. Odnotowano tam występowanie około 400 ich gatunków, w porównaniu z zaledwie trzema gatunkami roślin naczyniowych. Występują szeroko w obszarach wiecznych śniegów, podbiegunowych pustyniach lodowych, zasiedlają polarną tundrę i nunataki. Grzyby zlichenizowane zalicza się do organizmów ekstremofilnych, które są w stanie przeżyć w trudnych warunkach środowiskowych, takich, jak niskie temperatury i susza. Wydaje się, że kluczem do zrozumienia tej niezwyklej odporności jest poznanie molekularnych mechanizmów wiązania wody do powierzchni plechy. Celem moich badań jest poznanie procesu wiązania i zamarzania molekuł wody w próbkach antarktycznego grzyba zlichenizowanego z gatunku *Usnea arantiaco-atra*.

Badanie procesów hydratacji i rehydratacji plechy z fazy gazowej przeprowadzono metodą kinetyki hydratacji oraz izotermy sorpcyjnej. Wyodrębniono w tych układach trzy frakcje wody różniące się czasami hydratacji. Izoterma sorpcyjna zbudowana w oparciu o dane grawimetryczne przybiera postać sigmoidalną i znacząco lepiej opisywana jest modelem Denta, aniżeli BET.

Pomiary przeprowadzone metodą spektroskopii i relaksometrii $^1\text{H-NMR}$ potwierdzają występowanie puli wody o różnym stopniu związania do plechy. Widma $^1\text{H-NMR}$ są złożeniem funkcji Gaussa opisującej składową stałą sygnału protonowego oraz funkcji Lorentza opisującej uśredniony sygnał od protonów mobilnych próbki. W domenie czasu składową mobilną można przybliżyć funkcją dwueksponencjalną. Wpływ temperatury (w zakresie 297-210K) na dynamikę molekularną wody związanej w organizmie porostu dla różnych poziomów hydratacji zbadano za pomocą spektroskopii $^1\text{H-NMR}$. Analiza widm $^1\text{H-NMR}$ wykonanych dla różnych temperatur próbki pokazała dwa procesy unieruchamiania wody związanej, tj. kooperatywne zamarzanie dla wysokiego poziomu hydratacji ($\Delta m/m_0 = 0.68$) oraz niekooperatywne unieruchamianie molekuł wody dla próbek wysuszonych ($\Delta m/m_0 = 0.09$). Sygnał $^1\text{H-NMR}$ w funkcji uwodnienia opisywany jest funkcją wymierną. Analiza

całkowitego sygnału cieczowego w jednostkach sygnału stałego ujawniła występowanie frakcji rozpuszczalnej matrycy stałej porostu.

Spektroskopia relaksacyjna ^1H -NMR przeprowadzona w szerokim zakresie temperatur z wykorzystaniem sekwencji impulsów π - τ - $\pi/2$ -FID pozwoliła wyznaczyć czasy relaksacji spinowo-sieciowej dla poszczególnych linii widma ^1H -NMR, a także wyznaczyć energię aktywacji ruchów molekularnych.

Ponadto wykonano trasy kalorymetryczne DSC dla protokołów eksperymentalnych uwzględniających inkubację próbki w niskich temperaturach w celu dokładnej analizy procesów zamarzania wody związanej w próbkach antarktycznych grzybów zlichenizowanych. Zaobserwowano proces niekooperatywnego unieruchomienia molekuł wody oraz występowanie dyfuzji cząsteczek wody przechłodzonej i zjawisko narastania fazy stałej w plechach innych gatunków antarktycznych: *Turgidosculum complicatulum*, *Cetraria aculeata*, jak i u antarktycznego glonu *Prasiola crispa*.

Abstract

Lichens predominate in the Antarctic ecosystem - there are about 400 lichens species reported in this region. Lichens are example of organisms, which thrive under extreme condition, especially low temperatures and long periods of drought. The understanding of molecular mechanism of freezing and drying resistance requires a knowledge on water mobility for different steps of hydration level. The purpose of this study was to investigate process of binding and freezing of water in Antarctic extremophilic lichenized fungus *Usnea aurantiaco-atra*.

Gaseous phase hydration effect of *U. aurantiaco-atra* thallus was observed using hydration kinetics, sorption isotherm, ^1H -NMR spectroscopy and relaxometry. Three bound water fractions were distinguished: very tightly bound water, tightly bound water and loosely bound water. Sorption isotherm was sigmoidal and fitted well with Dent model. ^1H -NMR free induction decays were superpositions of solid signal component and two liquid components coming from a tightly an loosely bound water fraction. ^1H -NMR spectra recorded for *Usnea aurantiaco-atra* revealed one averaged mobile proton signal component. The total liquid signal component expressed in units of solid suggests the presence of water soluble fraction in thallus. DSC traces recorded after two-hour-incubation of *T.complicatulum*, of *P. crispa* and of *C.aculeata* thallus at -20°C suggest supercooled water molecules diffusion to ice microcrystallites resulting in solid phase growth. DSC melting peak can be decomposed into a main narrow peak (presumably melting of mycobiont areas) and a broad low temperature shoulder (presumably melting of isolated photobiont cells).

Spis publikacji Autorki:

1. Bacior M., Nowak P., Harańczyk H., Patryas S., Kijak P., Ligęzowska A., Olech M.A., Extreme dehydration observed in Antarctic *Turgidosculum complicatulum* and in *Prasiola crispa*, *Extremophiles* 21, 331-343 (2017).
2. P. Nowak, H. Harańczyk, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Lisowska, E. Baran, M. A. Olech "Bound water behaviour in *Cetraria aculeata* thalli during freezing", *Polar Biology* 41: 865-876 (2018)
3. M. Bacior, H. Harańczyk, P. Nowak, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Olech „Low-temperature immobilization of water in Antarctic *Turgidosculum complicatulum* and in *Prasiola crispa*: part I: *Turgidosculum complicatulum*”, *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* 173: 869-875, (2019)
4. H. Harańczyk , S. Kazimierz , K. Kubat, A. Andrzejowska, M. A. Olech, D. Jakubiec , P. Kijak, G. Palfner, A. Casanova-Katny „A comparative analysis of gaseous phase hydration properties of two lichenized fungi : *Niebla tigrina* (Follman) Rundel & Bowler from Atacama Desert and *Umbilicaria antarctica* Frey & I. M. Lamb from Robert Island, Southern Shetlands Archipelago, maritime Antarctica”, *Extremophiles*, 25, 267-283 (2021)
5. M. Bacior, H. Harańczyk, P. Nowak, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Olech, „Low-temperature investigation of residual water bound in free-living Antarctic *Prasiola crispa*, *Antarctic Science* 34: 389-400 (2022)
6. P.Kijak, H.Harańczyk, K.Kubat, A. Andrzejowska, M. Olech "Investigation of the process of water binding in the thallus of an antarctic lichen *Usnea aurantiaco-atra*" (w przygotowaniu)

Lista konferencji z udziałem Autorki:

1. P. Kijak, H. Harańczyk, M. A. Olech, K. Kubat, Badanie procesu wiązania i zamarzania wody w plesze antarktycznego porostu *Usnea aurantiaco-atra*. 45. Zjazd Fizyków Polskich, 13 – 18 Września 2019 Kraków, Polska, (Poster nr 124)

2. K. Kubat, H. Harańczyk, P. Kijak, A. Casanova-Katny, M. A. Olech, A. Bogdał, K. Strzałka, Własności hydratacyjne *Heterodermia leucomelos* i *Ramalina tigrina* z Pustyni Atacama. 45. Zjazd Fizyków Polskich, 13 – 18 Września 2019 Kraków, Polska (Poster nr 77)
3. M. Bacior, H. Harańczyk, P. Kijak, P. Nowak, J. Fitas, M. Marzec, M. Olech, Low temperature immobilization of endogeneous water in extremetolerant Antarctic lichen *Turgidosculum complicatulum*, 12th International Conference on Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substances ISEMA 2018, 4-7.06.2018, Lublin, Poland (Poster nr 8)
4. H. Harańczyk, P. Nowak, P. Kijak, J. Fitas, M. Marzec, M.A.Olech, K. Strzałka, Retarded ice growths in Antarctic lichen thalli, POLAR2018 A SCAR & IASC Conference, 15 - 26.06. 2018, Davos, Switzerland (Poster)
5. P. Kijak, H. Harańczyk, P. Nowak, M. Marzec, J. Fitas, A.A.Olech, K. Strzałka, ^1H -NMR and DSC monitoring of molecular mechanisms for extreme resistance on decreased temperature and on dehydration for Antarctic *Cetraria aculeata*”, The AMPERE NMR School, 10-16.06.2018, Zakopane, Poland (Poster nr 16)
6. M. Bacior, P. Nowak, P. Kijak, E. Baran, H. Harańczyk, M.A. Olech, Wpływ rehydratacji i przemarzania na plechę *Turgidosculum complicatulum* badany technikami ^1H -NMR, XLV Ogólnopolskie Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i Jego Zastosowań, IFJ, Kraków, 1-2.12.2014 (Poster nr 24)

1. GRZYBY ZLICHENIZOWANE

1.1 Grzyby zlichenizowane – charakterystyka ogólna

Grzyby zlichenizowane (łac. *Lichenes*), zwane dawniej porostami, w klasycznym ujęciu definiowane są jako proste związki organizmów: heterotroficznego grzyba i fotosyntetyzujących glonów lub sinic, rzadziej cyjanobakterii. Komponentem grzybowym najczęściej są workowce (Ascomycota), choć znane są porosty z kłębniczkowcami (Glomeromycota) i podstawczakami (Basidiomycota) [wg Tehlera i Wedina (2008) grupę tę stanowi zaledwie 20 gatunków]. Większość z około 20 000 opisanych gatunków porostów tworzą grzyby z glonami jako fotobiontem, podczas gdy zaledwie 10% porostów to związki z sinicami. Niewielka część (2 – 4%) grzybów zlichenizowanych może wiązać się z obydwoma rodzajami fotobiontów [Grimm et al. 2021].

Wielokrotnie potwierdzono tezę o dualistycznej naturze porostów przy pomocy eksperymentalnej lichenologii. Wykazano, że możliwe jest prowadzenie rozdzielnej hodowli biontów porostowych w warunkach laboratoryjnych - oddzielnie komponentu grzybowego i glonowego. Ponowna relichenizacja (resynteza) grzyba zlichenizowanego wiąże się jednak z trudnościami, głównie doбором odpowiedniej pożywki oraz konieczności prowadzenia hodowli w specyficznych dla odtwarzanego porostu warunkach fizjologicznego stresu. Ponowną syntezę grzyba zlichenizowanego udaje się osiągnąć przy włączeniu odpowiedniego czynnika stresowego (na przykład ograniczenia dostępu do wody i pokarmu) [Yoshimura i in., 1993, Stocker-Wörgötter, 2001].

Grzyby wraz z mikrobiologicznymi partnerami fotosyntezującymi budują całkowicie nową strukturę, których żaden z nich nie może wytworzyć samodzielnie. Proces przejścia partnerów ze stanu wolnego życia do stanu symbiozy (zwany lichenizacją), jak i dalsze jej utrzymanie pozostaje słabo poznany. Zwraca się uwagę na rolę metabolitów wtórnych porostów i odżywiania mineralnego jako czynników stabilizujących funkcje plechy [Pichler et al., 2023]. Interakcja grzybów z odpowiednimi fotobiontami jest niezbędna do wytworzenia

charakterystycznych form morfologii plechy, ale także do produkcji specjalistycznych metabolitów, które gromadzą się, często w znacznych ilościach, w postaci skrzystalizowanych związków porostowych w przestrzeniach międzykomórkowych.

Natura symbiozy porostowej między grzybowym a glonowym lub/i sinicowym komponentem jest skomplikowana. Wzajemna relacja między składnikami układu tworzącymi grzyb zlichenizowany wciąż jest przedmiotem badań i dyskusji. Zwykle opisuje się porost jako wielogatunkowy układ mutualistycznej symbiozy, w którym obaj partnerzy czerpią dla siebie korzyści [Grimm et al. 2021]. Heterotroficzny grzyb zapewnia fotosyntetyzującemu partnerowi odpowiednie środowisko do życia: stanowi podporę mechaniczną dla komórek glonu, a także dostarcza wodę i niezbędne sole mineralne, zaabsorbowane głównie z deszczu i wilgotnego powietrza. Osłania również partnera przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego. Dla przykładu pigmenty grzybów chronią komórki glonów i sinic przed intensywnym promieniowaniem UV. Tkanki utworzone ze strzępek grzyba decydują o masie porostu oraz nadają kształt plesze. Z kolei autotroficzne komórki glonu, zdolne do procesu fotosyntezy, pełnią rolę dostarczyciela wysokoenergetycznych związków węgla. Sinice wiążą również azot i dostarczają azot organiczny. Należy zauważyć, że to grzyb steruje rozmnażaniem glonu w tym układzie, przez co czasem uznaje się pasożytniczą rolę mykobionta w stosunku do fotobionta. W alternatywnym ujęciu porosty są uznawane za całe mikroekosystemy [Farrar, 1976] [Wrzosek et al., 2017] [Parasyri et al., 2018].

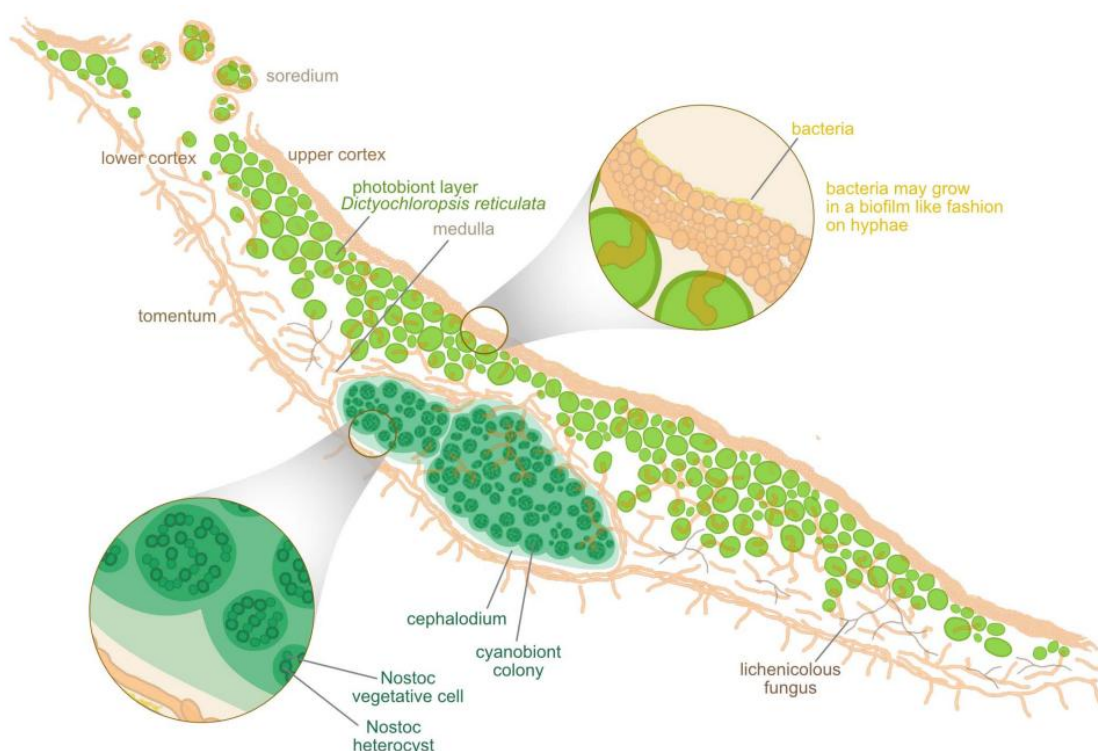
Cechy adaptacyjne grzybów zlichenizowanych (patrz rozdział 1.3) umożliwiają im kolonizację niemal wszystkich ekosystemów Ziemi. Ze względu na ich stosunkowo małe rozmiary i powolny wzrost (przykładowo tempo przyrostu plechy *Rhizocarpon geographicum* wynosi 0,25-0,5 mm rocznie [Matwiejuk, 2007]), zazwyczaj są zmuszone do rywalizacji o dostęp do światła słonecznego z roślinami naczyniowymi. Doskonale radzą sobie za to w ekstremalnie trudnych warunkach, co sprawia, że często rozwijają się w specyficznych niszach ekologicznych. Porosty dostosowały się do skrajnie trudnych warunków środowiskowych (susza, niskie temperatury, cykle zamarzania i rozmarzania, wysokie nasłonecznienie), porastając siedliska takie, jak pustynie, regiony polarnej i alpejskiej tundry, lasy borealne, skały na dużych wysokościach (nawet na wysokościach 7400 m), siedliska antarktyczne. Tworzą w tych miejscach niejednokrotnie dominującą szatę roślinną. Strategia

życiowa oparta o symbiozę mykobiontu i fotobiontu pozwala skolonizować siedliska lądowe, w których żaden inny organizm wielokomórkowy nie jest w stanie przetrwać. Dodatkowo metabolity wtórne wytwarzane w warstwie korowej sprawiają, że plecha porostu ochrania przed promieniowaniem UV i działa jak filtr światła. Porosty o zróżnicowanej formie plechy porastają powierzchnię skał, korę drzew, próchniejące kłody, dachy czy beton (Rys. 2). Co więcej licznie występują na świeżo odsłoniętych powierzchniach gleb i skał, w miejscach wypalonego lasu lub wycieku wulkanicznego, pełniąc rolę organizmów pionierskich.

Chociaż porosty są wybitnie odporne na warunki środowiska naturalnego, pozostają wyjątkowo wrażliwe na chemiczne zanieczyszczenia. Szczególnie niszczący jest dla nich dwutlenek siarki i inne substancje toksyczne pochodzące z atmosfery. Porost pobiera wodę bezpośrednio z wilgotnej atmosfery lub opadów, stąd woda nie ulega procesowi filtracji i oczyszczania przez glebę. Brak tkanki okrywającej sprawia, że zanieczyszczenia niesione z wodą mogą bezpośrednio wnikać i kumulować się w plesze. Komórki glonowe, które są szczególnie podatne na szkodliwy wpływ substancji toksycznych obumierają, co przy stosunkowo małej zawartości chlorofilu wpływa niszcząco na cały organizm i prowadzi do obumierania porostu. Wydaje się, że porosty są bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia środowiska, kiedy są metabolicznie aktywne. W ostatnich latach notuje się wysokie tempo wymierania gatunków grzybów zlichenizowanych, spowodowane głównie zanieczyszczeniami przemysłowymi i komunalnymi, a także chemizacją rolnictwa. Wiele gatunków objęto ochroną prawną. Grzyby zlichenizowane mogą pełnić rolę bioindykatora zanieczyszczeń środowiska. W latach 70. XX w. Hawksworth i Rose stworzyli skalę porostową, która pozwala na podstawie składu gatunkowego i częstości występowania grzybów zlichenizowanych ocenić stopień zanieczyszczenia powietrza.

Grzyby i glony to organizmy plechowe, nie wykształcają zwykłych tkanek, korzeni, łodyg czy liści. Strzępki grzyba mogą połączyć się z komórkami fotobionta, tworząc bardziej lub mniej zwartą plechę, zarówno pod względem anatomicznym, jak i fizjologicznym. Komórki grzyba i glonu mogą być rozłożone równomiernie tworząc plechę niewarstwową (homeometryczną) lub mogą być ułożone w wyraźne warstwy, wówczas tworzą plechę warstwową (heterometryczną). Przekrój poprzeczny przez plechę warstwową (która jest charakterystyczna dla większości grzybów zlichenizowanych) dla przykładu gatunku *Lobaria pulmonaria* przedstawiono na Rys. 1. Górna warstwa plechy, utworzona z ciasno

upakowanych grubościennych komórek grzyba nazywana jest korą. Komórki glonu wraz z luźno ułożonymi strzępkami grzyba tworzą warstwę pod górną korą. Kolejna warstwa, tak zwana warstwa rdzeniowa, to luźno ułożone komórki grzyba. Od spodu plechę ogranicza warstwa korowa dolna, często z wytworzonymi chwytnikami. Glony tworzą warstwę w „rusztowaniu” grzyba. Jako porost trójdzielny *L. pulmonaria*, oprócz glonów, zawiera jeszcze widoczne na rycinie skupiska cyjanobakterii.



Rys. 1 Schematyczny przekrój przez strukturę plechy grzyba zlichenizowanego z gatunku *Lobaria pulmonaria*. [Grimm et al., 2021, zmienione]

Grzyby zlichenizowane tworzą plechy o szerokiej gamie form morfologicznych. Na podstawie budowy i kształtu wyróżnia się trzy główne formy, mianowicie: skorupiastą, listkowatą, krzaczkowatą. Porosty skorupiaste przylegają do podłoża całą swoją dolną powierzchnią, a wiele gatunków może rozwijać się także w podłożu (na przykład wrastając w skały wapienne czy piaskowiec). Powierzchnia porostu jest gładka, ziarenkowata lub spękana, tworząc różnej barwy skorupki. Plechy listkowate przyjmują kształt spłaszczony, składający się z jednego lub kilku płatków (przypominającego listki) przytwierdzonych do

podłoża dolną częścią plechy lub chwytnikami. Plecha krzaczkowata wyraźnie odstaje od podłoża, tworzy charakterystyczne gałązki o różnym kształcie.

Jeśli chodzi o konsystencję plechy wysuszone są raczej kruche i łamliwe, natomiast uwodnione stają się bardziej sprężyste. Niektóre porosty zawierające cyjanobakterie charakteryzują się żelowatą konsystencją [Büdel and Scheidegger, 1996].



Rys. 2 Przykłady występowania plechy listkowatej a) *Hypogymnia physodes* porastającej korę drzewa b) *Xantoria parentia* porastającej blok wapienny [fot. Autorki]

1.2 Odporność na skrajne warunki środowiska

Grzyby zlichenizowane klasyfikowane są jako organizmy ekstremofilne. Liczne badania na przestrzeni lat potwierdzają ich zdolność do przetrwania w skrajnie trudnych warunkach środowiska naturalnego. Na szczególną uwagę w świetle prowadzonych w ramach tej rozprawy badań zasługuje odporność grzybów zlichenizowanych na działanie niskich temperatur oraz na wysuszenie.

Grzyby zlichenizowane tolerują powtarzające się w rytmie dobowym cykle zamrażania i rozmrażania w ich naturalnym środowisku [Kappen 1985]. Badania w warunkach laboratoryjnych wykazały odporność na znacznie niższe temperatury, niż panujące w naturalnych siedliskach. Przykładowo antarktyczne gatunki *Caloplaca elegans* i *Rhizoplaca melanophialma* przeżyły szybkie schładzanie do ciekłego azotu. Porosty z gatunku *Xanthoria mawsoni* i *Buellia frigida* pochodzące z siedlisk Antarktyki, czy też pochodzące z Europy Środkowej: *Lobaria pulmonaria* i *Cladonia rangiferina* przeżywają powolne, stopniowe schładzanie do temperatury -196°C i szybkie chłodzenie do temperatury -78°C [Kappen, 1993].

Nawet długoletnia inkubacja próbek w niskiej temperaturze nie powoduje ich obumarcia. Eksperymenty laboratoryjne wykazały zdolność grzybów zlichenizowanych do odzyskiwania aktywności metabolicznej po 10 latach odwodnienia, przechowywania w temperaturach poniżej 0°C i przy braku światła słonecznego [Kappen, 2000] [Kappen i Valladares, 2007]. Przykładowo, przechowywanie próbki *Alectoria ochroleuca* w temperaturze -60°C przez ponad trzy lata nie wpłynęło na reakcję fotosyntetyczną organizmu po rozmrożeniu [Larson, 1978], podobnie jak dwuletnia inkubacja plechy *Cladonia alpicornis* w temperaturze -15°C , nie wpłynęła negatywnie na procesy metaboliczne organizmu po ponownym ogrzaniu do temperatury 10°C [Lange, 1966].

Niektóre gatunki grzybów zlichenizowanych są zdolne do prowadzenia aktywnego procesu fotosyntezy w temperaturze poniżej 0°C oraz poniżej temperatury zamarzania płynów ustrojowych. Dla arktycznego grzyba zlichenizowanego z gatunku *Umbilicaria aprina* fotosynteza zachodzi w temperaturze -17°C w warunkach polowych, u *Usnea antarctica* w temperaturze -5°C , u *Usnea sphacelata* zaś w -10°C . Badania laboratoryjne próbki *Cladonia foliacea* pokazały u niej aktywność fotosyntetyczną w temperaturze nawet -24°C [Lange, 1965].

Grzyby zlichenizowane podejmują dwie podstawowe strategie obronne przed niszczącym wpływem zamarzania wody w tkankach [Harańczyk, 2003]. Pierwsza z nich to unikanie narastania krystalitów lodu w plesze. W obronie przed niszczącym wpływem niskich temperatur grzyb zlichenizowany może wydzielać substancje chroniące przed zamarzaniem, tzw. krioprotektanty. W plechach porostowych tę rolę odgrywają głównie

węglowodany proste oraz wieloalkohole (rybitol, mannitol, arabitol). Substancje te łatwo mieszają się z wodą, tworząc steryczne niedopasowanie między jej molekułami, skutecznie utrudniając tworzenie się krystalitów lodu.

Badania spektroskopowe $^1\text{H-NMR}$ wykazały, że niektóre gatunki (jak *Umbilicaria aprina* [Harańczyk et al., 2012], *Cetraria aculeata* [Nowak, 2013]) wykorzystują dodatkowy, wspomagający mechanizm molekularny w celu ochrony przed zamarzaniem. Polega on na wydzielaniu przez plechy substancji żelowych i w konsekwencji zwiększanie dostępnych, pierwotnych miejsc wiążących w matrycy stałej plechy. Woda luźno związana w organizmie, która mogłaby zamarzać w warunkach obniżonej temperatury zostaje ściśle związana do powierzchni.

Inną, skuteczną strategią broniącą przed niszczącym wpływem zamarzania wody jest stymulowany wzrost krystalitów lodu w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych podczas powolnego ochładzania plechy. Proces krystalizacji wody prowadzi jednocześnie do zmiany gradientów stężeń między komórką a płynem zewnątrzkomórkowym. Skutkuje odwodnieniem wnętrza komórki oraz zmianą jej objętości. Wzrostu stężenia elektrolitów w komórce powoduje obniżenie temperatury zamarzania – obserwujemy zjawisko przechłodzenia cieczy. Badania mikroskopowe pokazały narastanie krystalitów lodu w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych oraz zapadanie komórek grzybowych. [Schroeter i Scheidegger, 1995]. Indukowana nukleacja lodu w temperaturach powyżej -5°C została zaobserwowana dla grzybów zlichenizowanych z gatunku *Rhizoplaca*, *Xanthoparmelia* i *Xanthoria* [Kieft, 1988]. U arktycznego grzyba zlichenizowanego *Umbilicaria aprina* stwierdzono zamarzanie wody w temperaturze -5.4°C , tj. znacznie wyższej niż temperatura inicjacji fotosyntezy. Za regulację zamarzania wody w plechach odpowiadają substancje białkowe INA (od ang. *Ice Nucleating Agents*) [Kieft, Ruscetti, 1990]. Narastanie krystalitów lodu zdaje się nie tylko chronić tkanki, ale także w pewnych okolicznościach może przynosić korzyści. W siedliskach o ograniczonym dostępie do wody w stanie ciekłym kryształki lodu mogą stanowić swoisty magazyn wody, który może być wykorzystywany natychmiast po poprawieniu się warunków pogodowych.

Wydaje się, że opisane powyżej strategie radzenia sobie ze stresem związanym z niskimi temperaturami są stosowane przez porosty naprzemiennie, a rodzaj podejmowanej

strategii jest podyktowany poziomem hydratacji plechy. Dla niskich uwodnień porosty zwiększają udział wody niezamarzniętej. Dla wysokich uwodnień skuteczniejsze będzie stymulowanie powstawania lodu w przestrzeniach międzykomórkowych.

Ciekawym zagadnieniem z punktu widzenia prowadzonych w ramach rozprawy badań jest zatem gospodarka wodna grzybów zlichenizowanych. Opiera się ona właściwie całkowicie na właściwościach higroskopijnych plechy. W odróżnieniu od organizmów wyższych, porosty nie wykształciły organelli odpowiedzialnych za transport i magazynowanie wody w tkankach. Nie występują u porostów korzenie, kutikula czy epiderma. Grzyby zlichenizowane, jako organizmy poikilohydryczne, mają zdolność wiązania masy wody znacznie przekraczającej suchą masę plechy. Grzyby zlichenizowane zaopatrują się we wodę, nie tylko pobierając ją w stanie ciekłym, ale także bezpośrednio z pary wodnej z otoczenia, bez jej uprzedniego skroplenia. W szczególności gatunki porastające ekosystem Antarktyki mają zdolność pobierania pary wodnej sublimującej ze śniegu. Pobieranie wody odbywa się na zasadzie prostej fizycznej adsorpcji i jest uzależnione od warunków środowiska – głównie od temperatury i wilgotności względnej powietrza. Plechy grzybów zlichenizowanych są zdolne do wiązania znacznych ilości wody, przekraczających nierzadko ich własną suchą masę. Wykazano, że porost *Usnea sphacelata* osiąga poziom hydratacji równy $\Delta m/m_0 = 1.60$, a inny gatunek, *Ramalina terebrata* osiąga wartość $\Delta m/m_0 = 2.63$ [Kappen, 1983]. Będący przedmiotem tej pracy gatunek *Usnea aurantiaco-atra* uwadnia się do poziomu $\Delta m/m_0 = 1.64$ [Kappen et al. 1985].

Nawet drastyczna dehydratacja, na ogół nie powoduje obumierania plechy, ale prowadzi do stanu uśpienia, w którym ustaje aktywność metaboliczna organizmu. Poikilohydryczny charakter grzybów zlichenizowanych sprawia, że znoszą one niekorzystne warunki środowiska w stanie anhydrobiozy (anabiozy), tzw. „życia utajonego”, wywołanej głównie wysuszeniem [Crowe et al. 1992]. Kiedy grzyb zlichenizowany ulega procesowi głębokiego odwodnienia, plecha nie zapada się, utrzymuje naturalny kształt i w dużej mierze objętość. Wysuszona plecha traci często swoją elastyczność, staje się krucha i przypomina system porowaty. Przykładowo porowatość plechy zbadana metodą porozymetrii rtęciowej wynosi około 30 proc. dla gatunku *Lasallia hispanica* czy 10 proc. dla *Umbilicaria cinereorufescens* [Valladares et al. 1998]. Po ponownym uwodnieniu, grzyb zlichenizowany podejmuje funkcje życiowe. Maksimum wydajności procesu fotosyntezy rośnie w

przybliżeniu liniowo w funkcji uwodnienia, aż do wartości hydratacji, dla której przyjmuje optimum, a następnie spada wraz z dalszym wzrostem poziomu uwodnienia [Schroeter, Scheidegger, 1995]. Anhydrobioza zapewnia ogromną tolerancję na wysychanie [Hoekstra et al. 2001] [Schlensog et. Al. 2003] [Rebecchi et. Al. 2007]. W stanie anhydrobiozy zamrażanie nie wydaje się być czynnikiem ograniczającym przeżycie symbiontów porostowych. Anhydrobioza obejmuje dezaktywację fotosystemu II [Lange et al. 1989]. W ten sposób organizm unika akumulacji reaktywnych form tlenu (ROS), które uszkadzają niezbędne funkcje komórki [Kranner et al. 2005] [Wieners et al. 2012].

1.3 Grzyby zlichenizowane w kontekście astrobiologicznym

Poszukiwanie śladów występowania żywych organizmów na innych planetach, podobnie jak i badanie możliwości przenoszenia życia między planetami koncentrowały się dotychczas głównie wokół bakterii, ze względu na prostotę tego typu organizmów oraz potencjalną możliwość przetrwania podróży międzyplanetarnych. W kontekście ewolucyjnym grzyby zlichenizowane są organizmami powstałymi znacznie później niż bakterie. Zdolność grzybów zlichenizowanych do przetrwania i fotosyntetyzowania w skombinowanych, skrajnie niekorzystnych warunkach środowiska na Ziemi obejmujących: wysoki poziom promieniowania UV, szeroki zakres temperatur oraz długie okresy suszy sprawia, że w ostatnich latach również i porosty stają się obiecującym obiektem badań astrobiologicznych. Niektóre regiony występowania porostów na Ziemi charakteryzują się warunkami zbliżonymi do tych występujących w kosmosie, np. na Marsie czy na księżycu Jowisza - Europie. Przykładowo porosty występujące w Dry Valleys na Antarktydzie mogą rosnąć w siedliskach, których temperatury wahają się od 0°C do -50°C, z rocznymi opadami poniżej 50 mm [del la Torre, Sancho, 2020].

Na uwagę zasługuje złożoność grzybów zlichenizowanych – są to eukariotyczne, makroskopowe organizmy wielokomórkowe. Porosty można traktować w istocie jako mikrosystemy. Przez wzgląd na fakt, że integrują główne procesy metaboliczne

charakterystyczne dla życia na Ziemi: heterotrofię i autotrofię oraz obejmują trzy królestwa biologiczne: Cyanobacteria – Monera, Ascomycetes – Fungi oraz Chlorophyceae – Plantae uznawane są za system doskonale reprezentujący cechy życia na Ziemi [Sancho et al., 2008]

Jak wynika z testów prowadzonych m.in. w Międzynarodowej Stacji Kosmicznej ISS ramach projektów LIFE czy BIOPAN, niektóre gatunki jak *Xantoria elegans*, *Rhizocarpon geographicum* są w stanie przetrwać długotrwałą, otwartą ekspozycję do przestrzeni kosmicznej. Warstwa korowa plechy zapewnia wystarczającą ochronę przed promieniowaniem słonecznym. Po ekstremalnym odwodnieniu plecha odzyskuje w pełni swoją aktywność metaboliczną w ciągu 24 godzin. [Sancho et al., 2007] [Sancho et al., 2008]. Ponadto wykazano, że gatunek *Xantoria elegans* poddawany symulowanym warunkom marsjańskim (atmosfera, zmiany temperatury, profil wilgotności, promieniowanie UV) zachował zdolność fotosyntezy [de Vera, 2012] [Brandt, 2014]. Podobne wyniki uzyskano dla gatunku *Pleurosticta acetabulum* [Parasyri et al., 2018]

Badania pokazały różnice w zdolności do przetrwania, gdy mykobiont i fotobiont zostały odseparowane i poddane takim samym warunkom, jak forma zlichenizowana. W szczególności oddzielony fotobiont wykazuje większą wrażliwość, jeśli nie jest chroniony przez sąsiadujące komórki grzyba [de la Torre et al. 2002][de Vera et al., 2003] [de Vera et al., 2008] [de Vera, Ott 2010] [de Vera 2012]. Można postawić hipotezę, że układ symbiotyczny znacznie zwiększa zdolność symbiontów do przetrwania skombinowanych trudnych warunków w przestrzeni kosmicznej.

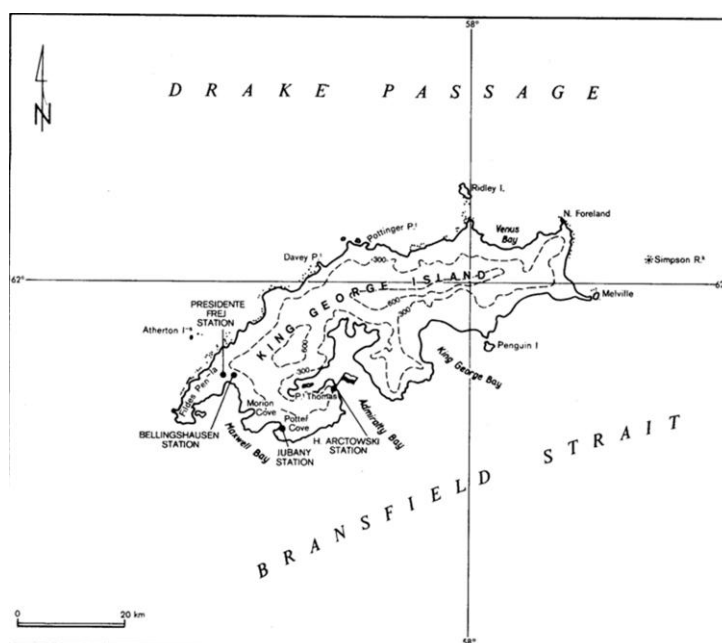
Endolityczne grzyby zlichenizowane stanowią obiecujący obiekt dla testowania teorii panspermii. Hipoteza litopanspermii opiera się na propozycji Thomsona (1871) i postuluje, że organizmy żywe przenoszone przy pomocy skał są zdolne do przetrwania podróży międzyplanetarnej i mogą być przenoszone z jednego ciała niebieskiego na inne. Taka podróż międzyplanetarna miałaby się składać z trzech podstawowych etapów: i) wyrzucenie materiału skalnego z powierzchni planety w przestrzeń kosmiczną (na przykład na skutek wybuchu wulkanu), ii) właściwa podróż międzyplanetarna, iii) ponowne wejście w atmosferę planety [Fajardo-Cavazos et al., 2005]. W ramach eksperymentu *Lithopanspermia* przeprowadzonego przez Europejską Agencję Kosmiczną w 2007 roku testowano

prawdopodobieństwo przetrwania podróży kosmicznej przez próbki porostowe. Po 10 dniach pełnej ekspozycji na warunki kosmiczne (promieniowanie słoneczne UV, promieniowanie kosmiczne, próżnia kosmiczna i ekstremalne temperatury) porosty z gatunków *R. geographicum*, *X. elegans* i *Circinaria gyrosa* i ich struktury reprodukcyjne (askospory) wykazały wysoką odporność.

Badania prowadzone nad grzybami zlichenizowanymi warunkach symulowanych oraz w ekspozycji do przestrzeni kosmicznej pokazują ich wysokie zdolności do przetrwania i regeneracji. Opisane wyżej eksperymenty mogą dać wgląd w mechanizmy, które żywe organizmy mogłyby potencjalnie wykorzystywać do przetrwania na innych niż Ziemia planetach. Pogłębiają wiedzę na temat powstawania życia, jego granic oraz ewolucji.

1.4 Charakterystyka badanych organizmów

Przedmiotem prowadzonych w ramach rozprawy badań były próbki grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra* pochodzące z Antarktyki Oceanicznej, Archipelag Szetlandów Południowych, Wyspa Króla Jerzego. Jest to gatunek endemiczny, występujący na terenach Ameryki Południowej oraz Antarktyki.



Rys. 3 Wyspa Króla Jerzego w Szetlandach Południowych, miejsce zebrania próbek *Usnea aurantiaco-atra*

Średnia roczna temperatura powietrza w siedlisku wynosi -2°C , najniższa zanotowana to $-32,3^{\circ}\text{C}$. Charakterystyczne dla tego obszaru są silne wiatry i wysoka wilgotność powietrza – stały napływ mas powietrza znad oceanu oraz pobliski lodowiec i występowanie śniegu sprawiają, że powietrze nad wyspą jest bogate w parę wodną [Rakusa-Suszczewski, 1992, Olech, 2004]. Średnia wilgotność powietrza na tym obszarze wynosi 83%, średnia prędkość wiatru to 8 m/s.

Trudne warunki wegetacji sprawiają, że szatę roślinną regionu tworzy niewielka liczba gatunków, głównie roślin niższych: grzybów zlichenizowanych, mchów, cyjanobakterii i glonów [Olech, 1992]. Rośliny naczyniowe są reprezentowane przez zaledwie trzy gatunki. Dominującą rolę we florze obszaru lądowego Zatoki Admiralicji, jak i w całej Antarktyce pełnią grzyby zlichenizowane. Notuje się występowanie około 400 ich gatunków na tym obszarze [Olech, 2004]. Badany gatunek *Usnea aurantiaco-atra* dominuje w szacie roślinnej Archipelagu Szetlandów Południowych.

Usnea auratiaco-atra należy do grzybów zlichenizowanych epilitycznych (naskalnych). Występuje na skałach śródlądowych, na wyższych wysokościach (powyżej 100 m). Preferuje stanowiska suche oraz dobrze eksponowane ściany skalne, niemniej obserwuje się także siedliska wśród mchów, na drewnie, czy porastające inne plechy z gatunku *Usnea antarctica* [Cao 2015]. *U. aurantiaco-atra* należy do gatunków nitrofobicznych. Często współwystępuje z innym naskalnym, nitrofobicznym porostem z gatunku *Himantoria lugubris* tworząc charakterystyczne dla krajobrazu antarktycznej tundry (a w szczególności Wyspy Króla Jerzego) zbiorowiska (ang. *communities*) [Olech, 2004]. Badania ekofizjologiczne wykazują, że to nie temperatura, ale wysuszenie środowiska (wpływające na okresy aktywności porosta) są kluczowe dla dystrybucji gatunku *U. aurantiaco-atra* [Laguna-Defior et al., 2015].

Badany organizm pod względem morfologicznym należy do grupy porostów krzaczkowatych. Plecha *U. aurantiaco-atra* tworzy wydatny główny „pień” z licznymi, cylindrycznymi rozgałęzieniami w górnej części. Osiąga wysokość od 3 do 13 cm. Tempo wzrostu dla tego gatunku to 4.5 do 5.5 mm/rok [Li et al. 2014]. Plecha przyjmuje kolor żółto-zielony, pstrokaty, z pasmami czarnego lub fioletowo-czarnego pigmentu. Powierzchnia plechy jest matowa, przechodząca w brodawkowato-pomarszczoną. Wytwarza owocniki w

kształcie dysków osiągające nawet do 2 cm średnicy [Olech 2004]. Co ciekawe *Usnea aurantiaco-atra* tworzy plechy anacznie zróżnicowane pod względem morfologicznym, przy tym samym genotypie zarówno mykobionta jak i fotobionta. Fakt ten sugeruje, że również inne czynniki mają wpływ na wygląd plechy, zatem grzyby zlichenizowane powinny być rozpatrywane raczej jako złożony mini-ekostystem, niżli tylko jako prosty układ symbiotyczny grzyba i glona. Ponieważ okazy *U. aurantiaco-atra* mające te same sekwencje ITS zarówno mykobiontu jak i fotobiontu wykazują różne fenotypy, jest to idealny przedmiot do badań elastyczności morfologicznej porostów [Cao, 2018].



Rys. 4 Wysuszona plecha *Usnea aurantiaco-atra* przechowywana w zielniku, fot. Autorki oraz natywna *Usnea aurantiaco-atra* w przybrzeżnym siedlisku w rejonie hiszpańskiej bazy antarktycznej Juan Carlos I, Isla Livingston, South Shetlands, Antarktyka Oceaniczna, 4 lutego 2018, w ramach 54. ECA (Expedición Científica Antártica - 54. chilijskiej wyprawy antarktycznej, fot. H.Harańczyk.

W ostatnich latach z powodzeniem próbuje się wykorzystywać *U. aurantiaco* – *atra* jako bioindykatora zanieczyszczeń powietrza pochodzących od działalności ludzkiej prowadzonej na terenie Antarktyki (stacje badawcze oraz turystyka) [Cargalo, 2021].

2. METODY BADAWCZE

2.1 Elementy teorii magnetycznego rezonansu jądrowego

Podstawą zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego, w skrócie NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) jest oddziaływanie jąder atomowych z zewnętrznym, stałym i zmiennym polem magnetycznym i polega na rezonansowym pochłanianiu energii przez układ spinów jądrowych próbki.

Jądro atomowe o nieparzystej liczbie protonów lub neutronów (tzw. jądra parzysto-nieparzyste) posiada niezerowy moment pędu $\mathbf{J}$ oraz wprost proporcjonalny do niego moment magnetyczny $\boldsymbol{\mu}$:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{J}, \quad (1)$$

gdzie współczynnik proporcjonalności γ to tzw. współczynnik giromagnetyczny, wyrażany w $\text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, charakterystyczny dla danego jądra atomowego. Podstawowe własności wybranych izotopów, istotnych z punktu widzenia badań biofizycznych zestawiono w Tabeli 1. Powszechne występowanie w próbkach biologicznych, wysoka naturalna abundancja oraz stosunkowo wysoka wartość współczynnika γ sprawia, że jądra wodoru ^1H są najczęściej obserwowanym jądrem w biofizycznych badaniach NMR.

Tabela 1. Właściwości wybranych jąder atomowych wykorzystywanych w NMR (na podst. [Hennel 2004])

Izotop	Liczba spinowa I	Czynnik giromagnetyczny $\gamma [10^7 T^{-1}s^{-1}]$	Naturalna abundancja [%]
^1H	$\frac{1}{2}$	26,752196	99,985
^2H	1	4,106625	0,015
^{13}C	$\frac{1}{2}$	6,72828	1,10
^{14}N	1	1,933778	99,63
^{15}N	$\frac{1}{2}$	-2,712621	0,366
^{19}F	$\frac{1}{2}$	25,18147	100
^{31}P	$\frac{1}{2}$	10,8394	100

Długość wypadkowego wektora momentu pędu można opisać:

$$|J| = \hbar \sqrt{I(I+1)}, \quad (2)$$

gdzie I to spin jądrowy.

Traktując moment pędu jako operator kwantowy $\mathbf{J} = \hbar \mathbf{I}$ równanie (1) przyjmie postać:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \hbar \mathbf{I}. \quad (3)$$

Jak wykazano w eksperymencie Sterna-Gerlacha rzut wektora $\mathbf{J}$ na kierunek osi kwantyzacji przyjmuje jedną z $(2I + 1)$ wartości. Zatem skwantowany jest również moment magnetyczny, proporcjonalny do momentu pędu. Wartości własne operatora z-owej składowej momentu magnetycznego przyjmują wartości: $-I\gamma\hbar, (-I+1)\gamma\hbar, \dots, (I-1)\gamma\hbar, I\gamma\hbar$.

Dla jąder wodoru ^1H , które są charakteryzowane przez $I = 1/2$, rzut momentu pędu na określony kierunek przyjmuje wartości $1/2\hbar$ lub $-1/2\hbar$. Składowa momentu magnetycznego wynosi: $\mu = \pm \gamma \hbar/2$. Jądro wodoru może przyjąć dwie równe energetycznie orientacje momentów magnetycznych (stan podwójnie zdegenerowany).

Zeeman jako pierwszy w 1896 roku zaobserwował rozszczepienie linii widmowych w zewnętrznym polu magnetycznym. Degeneracja stanu zostaje zniesiona na skutek oddziaływania momentu magnetycznego jądra z zewnętrznym polem magnetycznym o

indukcji B_0 . W dalszych rozważaniach, zgodnie z konwencją przyjmiemy, że oś OZ laboratoryjnego układu współrzędnych jest równoległa do wektora indukcji pola magnetycznego B_0 . Hamiltonian zeemanowski oddziaływania jądra z polem związany z rozszczepieniem poziomów energetycznych można wówczas przedstawić w następującej postaci:

$$H_z = -B_0 \gamma \hbar I_z. \quad (4)$$

Wartości własne hamiltonianu H_z są mogą przybierać wartości:

$$E(m) = -B_0 \gamma \hbar m, \quad (5)$$

gdzie m jest magnetyczną liczbą kwantową mogącą przyjmować $2(I_z + 1)$ wartości: $-I_z, -(I_z + 1), \dots, I_z$.

Różnica energetyczna między dwoma sąsiadującymi poziomami zeemanowskimi jest wprost proporcjonalna do iloczynu wartości indukcji pola i czynnik żyromagnetycznego γ :

$$\Delta E = 2\mu_z B_0 = \gamma \hbar B_0. \quad (6)$$

Dla jąder o spinie $I=1/2$ umieszczonych w zewnętrznym polu magnetycznym B_0 stan energetyczny rozszczepia się na dwa poziomy zeemanowskie i energia przyjmuje względem wartości $\pm 1/2 \gamma \hbar B_0$. Statystyczny stosunek obsadzeń obu poziomów energetycznych w makroskopowej próbce: α o liczbie kwantowej $m=+1/2$ i β o liczbie kwantowej $m=-1/2$ w warunkach równowagi termodynamicznej opisuje rozkład statystyczny Boltzmanna:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi k T}}, \quad (7)$$

gdzie N_α i N_β to liczba jąder na poziomach odpowiednio niższym i wyższym energetycznie, k to stała Boltzmanna, a T to temperatura bezwzględna.

Prawdopodobieństwo obsadzenia niższego energetycznie stanu β jest większe, niż prawdopodobieństwo obsadzenia stanu α .

Przejście do stanu α o wyższej energii wywołane może zostać rezonansową absorpcją kwantu energii o częstotliwości ν :

(8)

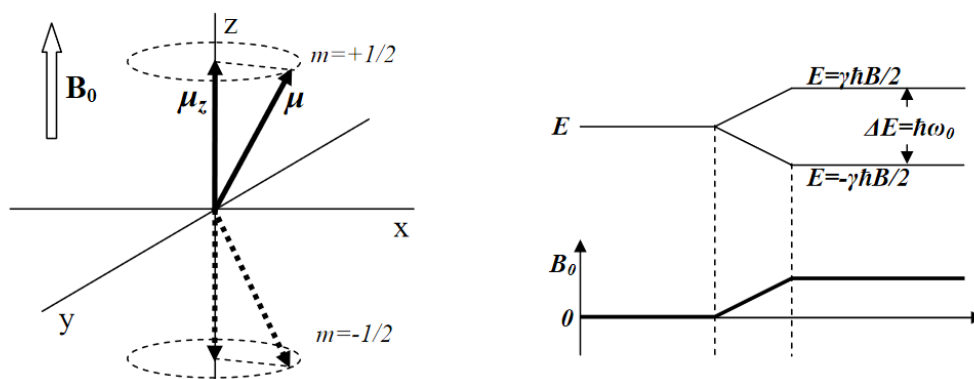
$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi},$$

lub inaczej:

(9)

$$\omega_L = 2\pi\nu = \gamma B_0.$$

Powyższe równanie (10) nazywamy *warunkiem magnetycznego rezonansu jądrowego*, natomiast rezonansową częstość ω_L częstością *Larmora*.



Rys. 5 a) Kwantowanie przestrzenne momentu magnetycznego w polu magnetycznym $\mathbf{B}_0$;
b) rozszczepienie poziomów energetycznych w efekcie Zeemana dla jąder o spinie 1/2

Dla próbki protonów, $\gamma = 26.75 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, w temperaturze pokojowej $T = 293 \text{ K}$ umieszczonych w polu magnetycznym o indukcji $B_0 = 1 \text{ T}$, różnica energii między sąsiednimi poziomami wynosi:

(10)

$$\Delta E = \gamma_H \cdot \hbar B_0 \approx 2,82 \cdot 10^{-26} \text{ J}$$

Stosunek liczby obsadzeń możemy policzyć na podstawie wzoru (8). Ponieważ wartość wykładnika eksponenty jest bliska zera, można uwzględnić tylko początkowe wyrazy rozwinięcia w szereg potęgowy:

(11)

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = 1 - \frac{\Delta E}{k T} = 0,999993.$$

Jak widzimy, stosunek liczby spinów na poziomach α i β jest bliski jedności: jeśli na poziomie α znajdowało się 10^6 spinów, to na poziomie β byłoby ich zaledwie o 7 więcej. Jednakże już tak niewielka różnica dla makroskopowej objętości próbki umożliwia obserwację zjawiska NMR.

2.1.1 Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego w ujęciu półklasycznym

W przypadku gdy zespół spinów znajduje się w stanie równowagi i nie oddziałuje z zewnętrznym polem magnetycznym, rozkład kierunków momentów magnetycznych w próbce jest całkowicie izotropowy. Wraz z pojawieniem się zewnętrznego pola magnetycznego o indukcji $\mathbf{B}_0$ zostaje wyróżniony w przestrzeni pewien kierunek.. Jądra zaczynają wykonywać ruch precesyjny wokół osi wyznaczonej przez to pole z charakterystyczną częstością kołową ω_0 zwaną częstością Larmora:

(12)

$$\omega_L = \gamma B_0.$$

przy czym kąt między kierunkiem pola $\mathbf{B}_0$ a precesującym wektorem $\boldsymbol{\mu}$ przybiera określone wartości - wartości z-owej składowej wektora momentu pędu są skwantowane (Rys. 5).

Dotychczasowa analiza dotyczyła zachowania się pojedynczych, nieoddziałujących ze sobą jąder atomowych, poddanych wpływowi zewnętrznego pola magnetycznego $\mathbf{B}_0$. Należy pamiętać, że w próbce makroskopowej każde jądro atomowe oddziałuje nie tylko z zewnętrznym polem magnetycznym, ale także z polami generowanymi przez momenty magnetyczne elektronów, jąder oraz ładunków znajdujących się w otoczeniu danego jądra. W każdej chwili moment magnetyczny jądra precesuje wokół kierunku pewnego wypadkowego pola, będącego złożeniem składowej $\mathbf{B}_0$ (silnego pola zewnętrznego) oraz niewielkiej składowej lokalnej.

Do opisu namagnesowania całej próbki definiuje się wielkość, zwaną magnetyzacją $\mathbf{M}$, wyrażoną jako suma wektorowa momentów magnetycznych wszystkich n jąder na jednostkę objętości próbki V :

$$\mathbf{M} = \frac{\sum_{i=1}^n \boldsymbol{\mu}_i}{V}, \quad (13)$$

Rozkład lokalnych pól magnetycznych w próbce na skutek ciągłych, chaotycznych ruchów termicznych jest izotropowy, co daje zerową wartość wektora magnetyzacji. Każde jądro atomowe znajduje się w nieco innym, zmiennym w czasie polu magnetycznym.

Umieścimy próbkę w zewnętrznym polu magnetycznym $\mathbf{B}_0$, skierowanym wzdłuż osi OZ . Rozkładając wektor magnetyzacji na składowe M_x, M_y, M_z można stwierdzić, że składowe M_x, M_y wirują chaotycznie wzajemnie się zerując, natomiast składowa M_z pozostaje stała:

$$M_x = \frac{\sum_{i=1}^n \mu_{x,i}}{V} = 0, \quad (14)$$

$$M_y = \frac{\sum_{i=1}^n \mu_{y,i}}{V} = 0, \quad (15)$$

$$M_z = \frac{\sum_{i=1}^n \mu_{z,i}}{V} \neq 0. \quad (16)$$

W stanie równowagi termodynamicznej magnetyzacja próbki jest równoległa do kierunku pola magnetycznego o indukcji $\mathbf{B}_0$.

Jądro atomowe o momencie magnetycznym $\boldsymbol{\mu}$ umieszczone w zewnętrznym, stałym polu magnetycznym o indukcji $\mathbf{B}_0$ posiada energię równą:

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0. \quad (17)$$

Warto zauważyć, że w polu $\mathbf{B}_0$ w kierunku z , jedynie zmiana z -owej składowej magnetyzacji jądrowej zmienia wartość energii magnetycznej układu spinów jądrowych.

Na wektor magnetyzacji $\mathbf{M}$ działa pochodzący od pola $\mathbf{B}_0$ zewnętrzny moment siły $\mathbf{N}$:

$$\mathbf{N} = \mathbf{M} \times \mathbf{B}_0. \quad (18)$$

Zmiana momentu pędu w czasie dana jest równaniem:

$$\frac{d}{dt} \mathbf{J} = \mathbf{N}. \quad (19)$$

W układzie znajdującym się w spoczynku ruch wektora magnetyzacji opisywany jest równaniem:

$$\frac{d}{dt} \mathbf{M} = \gamma \mathbf{M} \times \mathbf{B}_0. \quad (20)$$

Częstość precesji (Larmora) momentu magnetycznego w polu zewnętrznym przyjmuje postać:

$$\omega_L = \gamma B_0. \quad (21)$$

Transformując równanie (20) do wirującego wokół osi OZ układu współrzędnych, równanie ruchu wektora magnetyzacji otrzymujemy postać:

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \gamma \mathbf{M} \times \left(\mathbf{B}_0 + \frac{\boldsymbol{\omega}}{\gamma} \right). \quad (22)$$

W tym przypadku można powiedzieć, że wektor magnetyzacji doznaje działania efektywnego pola magnetycznego o indukcji $\mathbf{B}_0 + \boldsymbol{\omega}/\gamma$ (patrz równania: (21) i (22)). W szczególności w układzie wirującym z częstością równą $\boldsymbol{\omega} = -\gamma \mathbf{B}_0$ efektywne pole magnetyczne zeruje się.

Jeśli teraz zadziałać na układ spinów dodatkowym, zmiennym w czasie polem magnetycznym $\mathbf{B}_1$, skierowanym prostopadle do kierunku pola $\mathbf{B}_0$, wirującym z prędkością kątową $\boldsymbol{\omega}$ w układzie laboratoryjnym równanie ruchu wektora magnetyzacji $\mathbf{M}$ przyjmie postać:

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \gamma \mathbf{M} \times \left(\mathbf{B}_0 + \frac{\boldsymbol{\omega}}{\gamma} + \mathbf{B}_1 \right). \quad (23)$$

Efektywne pole, któremu poddawany jest moment magnetyczny powiększone jest teraz o czynnik B_1 . Natomiast w układzie wirującym z częstością Larmora, $-\omega$, jedynym polem magnetycznym, jakie „widzi” moment magnetyczny jest pole B_1 . Wówczas moment magnetyczny wykonuje precesję wokół pola B_1 , z częstością γB_1 .

Podsumowując: poddając próbkę działaniu zmiennego pola magnetycznego B_1 o znacznie mniejszej amplitudzie i wirującego z częstością kołową Larmora ω_L , możemy zmienić wartość magnetyzacji jądrowej próbki umieszczonej w stałym, silnym polu B_0 . Opisane wyżej zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego stanowi podstawę technik spektroskopowych NMR. Współcześnie w spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystuje się krótkie impulsy pola B_1 (metody impulsowe).

2.1.2 Zjawiska relaksacji

Na skutek działania impulsu B_1 z poszczególnymi momentami magnetycznymi jąder wypadkowy wektor magnetyzacji jądrowej M ulega wychyleniu z położenia równowagi (obrotowi) – wektor M zaczyna precesować wokół tego pola z prędkością kątową $-\gamma B_1$. Pojawiają się niezerowe, poprzeczne składowe wektora M w wirującym układzie współrzędnych. Po ustaniu impulsu zmiennego pola magnetycznego B_1 wychylona z położenia równowagowego magnetyzacja jądrowa powraca do wartości równowagowej. Mówimy, że wektor magnetyzacji relaksuje, a sam proces nazywa się relaksacją jądrową. Odbudowywanie się wartości składowej podłużnej wektora magnetyzacji M_z w czasie opisuje równanie różniczkowe postaci:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1}. \quad (24)$$

Proces przebiega eksponencjalnie, zgodnie z równaniem:

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - \exp \frac{-t}{T_1} \right) \quad (25)$$

Parametrem w równaniu (24) jest czas relaksacji podłużnej T_1 , zdefiniowany jako czas, po którym podłużna składowa wektora magnetyzacji osiąga $1/e$ wartości początkowej.

Procesie relaksacji podłużnej wiąże się z oddawaniem energii układu spinów jądrowych do otoczenia, czyli do sieci. Stąd często opisany proces nazywa się *relaksacją spin-sieć* (spinowo-sieciową).

Działanie impulsu zmiennego pola $\mathbf{B}_1$, którego częstość jest równa lub bliska częstości Larmora (czyli spełnia warunek rezonansu) powoduje powstanie składowej poprzecznej wektora magnetyzacji M_{xy} na skutek korelacji faz spinów jądrowych. Po wyłączeniu impulsu składowa M_{xy} nie znika natychmiast. Jej zanik w czasie można opisać równaniem różniczkowym:

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2}, \quad (26)$$

z rozwiązaniem w postaci:

$$M_{xy} = M_{0xy} \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right). \quad (27)$$

Parametrem w równaniach (26) i (27) jest tzw. czas relaksacji poprzecznej T_2 i jest definiowany jako czas po którym wartość magnetyzacji w płaszczyźnie XY wynosi 1/e wartości początkowej. Proces relaksacji poprzecznej spowodowany jest przez oddziaływania między spinami, stąd nazywa się go czasem *relaksacji spin-spin* (spinowo-spinową).

Na czas relaksacji T_2 wpływają nie tylko oddziaływania między spinami w próbce, ale także niejednorodności stałego pola magnetycznego $\mathbf{B}_0$. Niejednorodności pola skracają czas relaksacji T_2 . Oba czynniki uwzględnia tzw. efektywny czas relaksacji poprzecznej T_2^* , zdefiniowany jako:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0, \quad (28)$$

gdzie przez ΔB_0 oznaczono niejednorodność stałego pola magnetycznego działającego na badaną próbkę.

Zachowanie się składowych wektora magnetyzacji pod wpływem stałego pola $\mathbf{B}_0$ po ustaniu impulsu pola $\mathbf{B}_1$ z uwzględnieniem zjawiska relaksacji opisują fenomenologiczne równania różniczkowe pierwszego rzędu, nazywane równaniami Blocha :

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B}_0)_z + \left(\frac{M_0 - M_z}{T_1} \right) \quad (29)$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B}_0)_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (30)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B}_0)_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (31)$$

Czasy relaksacji T_1 i T_2 są niezwykle ważnymi wielkościami dla eksperymentatora, gdyż niosą informację na temat badanego układu – są zależne od struktury związków oraz ruchów molekularnych w próbce.

2.1.3 Mechanizmy relaksacji jądrowej

Zewnętrzne pole magnetyczne nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na energię jądra. Relaksacja jądrowa to proces związany z oddziaływaniami układu spinów jądrowych z otoczeniem termodynamicznym (nazywanym siecią). W próbkach biologicznych najistotniejsze w procesie relaksacji są: oddziaływanie dipolowe, anizotropia przesunięcia chemicznego, oddziaływanie skalarne, oddziaływanie kwadrupolowe oraz oddziaływanie dipolowe z niesparowanymi elektronami paramagnetyków elektronowych (w wolnych rodnikach lub w jonach paramagnetycznych) [Hausser, Kalbitzer, 1993]. Najpowszechniejszym mechanizmem jest oddziaływanie dipol-dipol, czyli sprzęganie między momentem magnetycznym jądra, a momentem magnetycznym innego jądra lub elektronu, atomu, cząsteczki. Działanie jednego dipola na drugi sprawia, że spin sąsiedniego jądra znajduje się w dodatkowym polu lokalnym $\mathbf{B}_{loc}$, skutkiem czego linia absorpcji ulega rozszczepieniu.

Weźmy dwa oddziałujące ze sobą jądra umieszczone w zewnętrznym polu magnetycznym $\mathbf{B}_0$: I_1 o współczynniku żyromagnetycznym γ_1 i momencie magnetycznym $\mu_1 = \gamma_1 \hbar I_1$ oraz I_2 o współczynniku żyromagnetycznym γ_2 i momencie magnetycznym $\mu_2 = \gamma_2 \hbar I_2$. Hamiltonian H takiego układu można zapisać w postaci sumy:

$$H = H_0 + H_{dipol}, \quad (32)$$

gdzie: H_0 to hamiltonian Zeemana oddziaływania z zewnętrznym polem magnetycznym, a H to hamiltonian oddziaływania dipolowego.

Energia potencjalna układu dwóch oddziałujących ze sobą dipoli o momentach magnetycznych μ_1 i μ_2 dana jest wzorem:

$$E_{dipol} = \frac{\mu_1 \circ \mu_2}{r^3} - \frac{3(\mu_1 \circ \mathbf{r})(\mu_2 \circ \mathbf{r})}{r^5}, \quad (33)$$

gdzie $\mathbf{r}$ jest wektorem wodzącym od μ_1 do μ_2 .

Hamiltonian dipolowy dla układu znajdującego się w równowadze termodynamicznej zapisany we współrzędnych sferycznych r, θ, Φ w układzie o środku zaczepionym w miejscu spinu 1. przyjmuje postać:

$$H_{dipol} = d(1 - 3 \cos^2 \theta) [I_1 I_2 - \frac{1}{4} (I_1^+ I_2^- + I_1^- I_2^+)] \quad (34)$$

dla układu identycznych spinów $\gamma_1 = \gamma_2$ oraz:

$$H_{dipol} = d(1 - 3 \cos^2 \theta) (I_1 I_2) \quad (35)$$

dla układu różnych spinów $\gamma_1 \neq \gamma_2$. Występujący w powyższych wzorach (34) i (35) parametr

d to stała sprzężenia dipolowego definiowana jako: $d = \frac{\mu_0 \gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{4\pi r^3}$.

2.1.4 Czas korelacji

Czasy relaksacji: spin-sieć T_1 oraz spin-spin T_2 związane są z czasem korelacji ruchów molekularnych układu rezonujących spinów jądrowych, τ_c . Definiuje się ją, jako średni czas, jaki zajmuje molekule obrót o 1 radian. Przykładowo w cieczach, gdzie molekuly poruszają się szybko, czas korelacji będzie krótki.

W 1948 roku Nicolas Bloembergen, Edward Mills Purcell i Robert Pound zaproponowali tak zwaną teorię Bloembergena-Purcella-Pounda (teorię BPP), wiążącą czasy relaksacji jądrowej z czasem korelacji ruchów molekularnych dla pary spinów:

(36)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{(\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} \right)$$

(37)

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar}{r^6} \left(4\tau_c + \frac{\tau_c}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_2^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} \right)$$

gdzie ω to częstość Larmora, γ to czynnik giromagnetyczny, r to odległość między dwoma relaksującymi spinami.

Dla pary jednakowych spinów równania (36) i (37) przyjmują uproszczoną postać:

(38)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right)$$

(39)

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar}{r^6} \left(3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right)$$

Teoria BPP zakłada, że funkcja autokorelacji fluktuacji pola powodujących relaksację jest proporcjonalna do czynnika e^{-t/τ_c} . Czas korelacji można zapisać relacją Arrheniusa:

(40)

$$\tau_c = \tau_c \exp(E_A/RT)$$

gdzie: τ_c to współczynnik proporcjonalności, E_A to energia aktywacji ruchów molekularnych, czyli minimalna ilość energii potrzebna do pokonania bariery energetycznej między dwoma minimami o równej głębokości, R to stała gazowa. Zależność odwrotności czasów relaksacji T_1 i T_2 od temperatury osiąga minimum dla $\omega\tau_c = 0.616$, gdzie ω jest częstością pracy spektrometru.

W zależności od temperatury można stosować przybliżenia powyższych wzorów:

(i) w niskich temperaturach, gdzie ruch cząsteczki jest wolniejszy od częstości obserwacji ($\omega\tau_c > 0.616$):

(41)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar}{r^6} \frac{2}{\omega^2 \tau_c}$$

(42)

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(3\tau_c + \frac{11}{2\omega^2 \tau_c} \right)$$

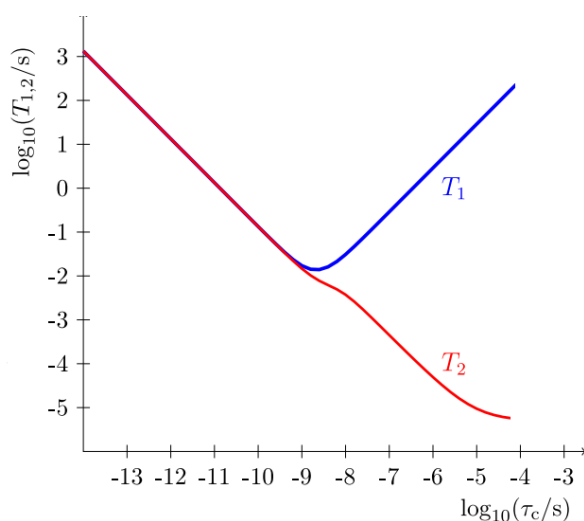
(ii) dla wysokich temperatur, gdzie ruch cząsteczki jest szybszy od częstości obserwacji ($\omega\tau_c < 0.616$):

(43)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} 5\tau_c$$

(44)

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{2} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \tau_c$$



Rys. 6 Czasy relaksacji podłużnej i poprzecznej T_1 , T_2 w funkcji czasu korelacji τ_c

2.1.5 Kształt linii rezonansowej w spektroskopii NMR

Ruchy molekularne odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniach dipolowych, co znajduje odzwierciedlenie w kształcie linii widma NMR. Gdyby rozważyć układ identycznych, izolowanych jąder atomowych umieszczonym w zewnętrznym, idealnie jednorodnym i stałym polu magnetycznym zarejestrowany sygnał zaniku swobodnej precesji miałby dokładnie kształt funkcji jednoeksponencjalnej. Taki sygnał FID poddany transformacji Fouriera dałby nieskończenie wąską linię rezonansową o kształcie funkcji delta Diraca. W pomiarach NMR rzeczywistych próbek, gdzie jądra oddziałują ze sobą, a pole $\mathbf{B}_0$ nigdy nie jest idealnie jednorodne, rejestrowany sygnał FID jest złożony ze składowych o różnych częstościach rezonansowych. W konsekwencji linia widma w domenie częstości

przyjmuje określoną strukturę i szerokość. Starannie przeprowadzona analiza kształtu zarejestrowanej linii w widmie NMR niesie cenne informacje o naturze zaobserwowanych zjawisk rezonansowych.

Widmo NMR cieczy obejmuje bardzo wąski zakres częstości, podczas gdy widmo ciała stałego jest bardzo szerokie. Powodem tego są ruchy molekularne, które uśredniają pola lokalne i prowadzą do zwężenia linii w przypadku cieczy. Natomiast w ciałach stałych, niezmiennicze w czasie położenie atomów nie powoduje uśrednienia się pól lokalnych, które powodują zachodzenie rezonansu w różnych wartościach pola B_0 , zgodnie ze wzorem $\omega_0 = \gamma(B_0 \pm \Delta B_{loc})$. Temperatura ma duży wpływ na kształt linii NMR, ponieważ wzrost temperatury aktywuje ruchy od drgających przez rotacyjne aż po translacyjne, co prowadzi do zwężania się linii widma w przypadku cieczy, a rozszerzenia w przypadku ciał stałych.

W cieczach molekuly poruszają się szybko w sposób chaotyczny, a lokalne pola magnetyczne uśredniają się do zera. Zgodnie z równaniami Blocha Sygnał FID opisywany jest wówczas funkcją eksponencjalną. W domenie częstości zanikowi eksponencjalnemu odpowiada linia o kształcie funkcji Lorentza $L(\omega)$:

$$L(\omega) = \frac{\Delta\omega_{1/2}}{(\frac{\Delta\omega_1}{2})^2 + (\Delta\omega)^2} \quad (45)$$

gdzie: $\Delta\omega = \omega_L - \omega$, a $\Delta\omega_{1/2}$ jest połową szerokości linii w połowie jej wysokości (tzw. szerokością połówkową).

Zachodzi związek pomiędzy szerokością połówkową linii Lorentza, a efektywnym czasem relaksacji podłużnej T_2^* , mianowicie:

$$\Delta\omega_{1/2} = \frac{1}{T_2^*} \quad (46)$$

Kiedy w badanej próbce cieczowej występuje n podukładów molekuł różniących się ruchliwością oraz w przypadku braku wymiany magnetyzacji pomiędzy podukładami, sygnał NMR jest złożeniem n funkcji Lorentza.

W ciele stałym molekuly są uporządkowane w sieci i wykonują jedynie niewielkie drgania wokół swoich położeń równowagi. Lokalne pola magnetyczne nie uśredniają się do zera. Poszczególne jądra podlegają wówczas działaniu pola efektywnego $\mathbf{B}_{ef} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_{loc}$, gdzie $\mathbf{B}_{loc}$ to pole lokalne wytworzone przez otoczenie chemiczne jądra rezonansowego, zmieniającego linię NMR. Wzbudzenie następuje w szerokim zakresie częstości. Zatem żeby opisać sygnał pochodzący od protonów ciała stałego, należy więc posłużyć się modelem bardziej złożonym niż dla sygnału cieczowego.

Sygnał NMR w domenie czasu pochodzący od ciała stałego w próbkach biologicznych często opisywany jest tzw. funkcją Abragama, będącą iloczynem funkcji sincus oraz funkcji Gaussa:

(47)

$$FID(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2 \frac{\sin at}{at}$$

gdzie a jest tak zwanym parametrem Abragama, odpowiadającym szerokości połówkowej linii w domenie częstości [Abragam, 1961]. Model funkcji Abragama jest często stosowany w przypadku próbek krystalicznych oraz w fazie szklistej [Derbyshire et al., 2004].

Funkcja Abragama (47) poddana transformacji Fouriera przyjmuje postać splotu funkcji schodkowej o szerokości połówkowej a i funkcji Gaussa [Cowan, 2005]. Jednak najczęściej stosowanym i wystarczającym modelem opisu sygnału NMR od ciała stałego w układach biologicznych jest funkcja Gaussa:

(48)

$$A(\nu) = \frac{A_s}{\Delta\nu_s \sqrt{\pi \ln 2}} \exp\left[-2 \cdot \left(\frac{\nu - \nu_s}{\Delta\nu_s \sqrt{2 \ln 2}}\right)^2\right]$$

gdzie $\Delta\nu_G$ to szerokość połówkowa linii Gaussa, a ν_G , to położenie pików linii Gaussa.

Zasadność stosowania takiego opisu można przetestować rozwijając składową stałą sygnału zaniku swobodnej precesji FID w szereg momentów linii. Znormalizowaną funkcję

kształtu linii rezonansowej $f(\omega)$ przyjmując maksimum w punkcie ω_0 można przedstawić w postaci szeregu potęgowego momentów, gdzie n -ty moment jest definiowany jako całka:

(49)

$$M_n = \int (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega.$$

Stałą składową w sygnale zaniku swobodnej precesji FID można rozwinąć w szereg momentów statystycznych linii:

(50)

$$FID(t) = \sum_n M_{2n} (-1)^n \frac{t^{2n}}{(2n)!}$$

Moment zerowego rzędu M_0 jest polem pod krzywą rezonansową. Momenty nieparzyste dla symetrycznych linii absorpcyjnej $f(\omega)$ zerują się, tzn.: $M_n = 0$ przy $n = 2x + 1$, $x \in \mathbb{N}$:

(51)

$$S(t) = S \left(1 - \frac{M_2}{2!} t^2 + \frac{M_4}{4!} t^4 + \frac{M_6}{6!} t^6 + \dots \right)$$

Po rozwinięciu funkcji (48) w szereg momentów można policzyć dla niej iloraz $M_4/M_2^2 = 3$ [Abragam, 1961]. że Dla arktycznego grzyba zlichenizowanego *Cladonia mitis* uzyskano wynik $M_4/M_2^2 = 2.3$ [Harańczyk i in., 1998], natomiast dla gatunku *Cetraria aculeata* $M_4/M_2^2 = 2.7$ [Nowak, 2013]. Obie wartości są zbliżone do 3.0; wydaje się zatem, że w pierwszym przybliżeniu, można stosować model Gaussa dla próbek porostowych.

Przy zastosowaniu krótkiego impulsu pola $\mathbf{B}_1$ otrzymuje się szeroki przedział częstości wzbudzania protonów. Poddając próbki biologiczne działaniu bardzo krótkiego impulsu $\mathbf{B}_1$ uzyskuje się sygnał zarówno od protonów cieczy, jak i od ciała stałego. Wynikiem takiego pomiaru jest niehomogenna linia będąca złożeniem sygnałów od cieczy i od ciała stałego. FID

taki może być z powodzeniem opisywany sumą funkcji Gaussa i eksponenty natomiast widmo sumą funkcji Gaussa i funkcji Lorentza.

2.1.6. Impulsowe metody NMR. Sygnał swobodnej precesji FID

Istnieją dwie główne metody badania magnetycznego rezonansu jądrowego. Pierwsza z nich, zwana metodą fali ciągłej (w skrócie *CW* od *ang. Continuous Wave*) polega na wystawieniu próbki na działanie zewnętrznego pola magnetycznego $\mathbf{B}_0$, którego indukcja zmienia się w czasie (jest to tzw. "przemiatanie polem"), jednocześnie utrzymując stałe pole $\mathbf{B}_1$ o częstotliwości radiowej zbliżonej do rezonansowej. Wynikiem takiego badania jest wykres zależności amplitudy sygnału NMR od wartości indukcji pola $\mathbf{B}_0$ lub od częstotliwości.

W 1965 roku Erwin Hahn wprowadził drugą metodę impulsowa NMR, która przy intensywnym rozwoju algorytmów transformaty Fouriera w tamtym czasie niemal całkowicie zastąpiła metodę fali ciągłej. Metoda Hahna jest zdecydowanie bardziej czuła, a przy tym mniej czasochłonna.

W metodzie impulsowej jako wirujące pole $\mathbf{B}_1$ stosuje się impulsy fali elektromagnetycznej o częstotliwości radiowej. Działanie na próbkę impulsem wirującego pola $\mathbf{B}_1$ o wysokiej częstotliwości powoduje odchylenie wektora magnetyzacji od kierunku wyznaczanego przez $\mathbf{B}_0$ i powstanie składowej poprzecznej $\mathbf{M}_{xy}$. Kąt α odchylenia wektora magnetyzacji $\mathbf{M}$ jest dany zależnością:

$$\alpha = \gamma B_1 t_p, \quad (52)$$

gdzie t_p jest długością impulsu. Dobierając odpowiednio czynniki B_1 i t_p można uzyskać żądany kąt odchylenia wektora $\mathbf{M}$. Stosując impuls obracający magnetyzację na płaszczyznę XY (czyli gdy $\alpha = \pi/2$) uzyskamy maksymalną wartość natężenia odbieranego sygnału. Taki impuls nazywa się impulsem $\pi/2$ i obok impulsu π , który odwraca namagnesowanie (tzw. inwersja magnetyzacji), jest impulsem najczęściej wykorzystywanym w eksperymentach NMR.

Po zakończeniu impulsu koniec wektora składowej poprzecznej zakreśla „spiralę” w laboratoryjnym układzie odniesienia i zanika. Zgodnie z prawem Faradaya, zmienna indukcja magnetyczna $\mathbf{B}_1$ indukuje zmienną siłę elektromotoryczną w cewce odbiorczej. Cewki odbiorcze rejestrują zanikający eksponencjalnie z czasem T_2 sygnał elektryczny. Sygnał ten nazywany jest *sygnałem swobodnej precesji* lub *sygnałem FID* od ang. *Free Induction Decay*.

Obserwowany w metodach impulsowych NMR sygnał FID, będący zależnością siły elektromotorycznej w funkcji czasu, dostarcza pełnej informacji o sygnale w domenie częstości. Sygnał w domenie czasu $F(t)$ i w domenie częstości $G(\omega)$ są związane transformatą Fouriera :

$$F(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} G(\omega) \exp(i\omega t) d\omega \quad (53)$$

$$G(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} F(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (54)$$

Całki (53) i (54) oblicza się numerycznie z wykorzystaniem algorytmu szybkiej transformacji Fouriera FFT (z ang. *Fast Fourier Transform*). Wynikiem poddania sygnału FID operacji FFT jest zależność amplitudy sygnału NMR od częstości z maksimum przypadającym na częstość Larmora.

Podstawowy układ do przeprowadzenia impulsowego eksperymentu NMR zawiera: magnes wytwarzający stałe pole o indukcji $\mathbf{B}_0$, w którym umieszczamy próbkę, generator oscylującego pola $\mathbf{B}_1$ oraz cewkę nadawczo-odbiorczą, podającą impuls NMR oraz odbierającą sygnał od próbki. Nie korzysta się z wirującego pola $\mathbf{B}_1$, ale z dającego się znacznie łatwiej wytworzyć pola drgającego. Pole takie można rozłożyć na dwie składowe: jedną wirującą z prędkością kątową ω i drugą wirującą z prędkością kątową $-\omega$ o takiej samej wartości indukcji $\mathbf{B}_1$. Pole o częstotliwości zbliżonej do rezonansowej wytwarza prąd przepływający przez cewkę, podłączoną do nadajnika RF zaś wpływ składowej anty-Larmorowskiej można zignorować.

Stałe pole $\mathbf{B}_0$ jest wytwarzane przez magnes nadprzewodzący lub przez elektromagnes. Wymaga się, by pole to było homogeniczne w obrębie próbki i miało dużą

wartość indukcji. Za poprawę jednorodności pola odpowiada układ cewek korekcyjnych (ang. *shim coils*), które poprzez wytwarzanie dodatkowego pola magnetycznego kompensują odchylenia od jednorodności.

Głównym elementem spektrometru jest głowica, w której umieszcza się próbkę. W głowicy znajdują się cewki nadawcza i odbiorcza potrzebne do wzbudzenia i detekcji sygnału swobodnej precesji badanego układu spinów. Ponadto większość komercyjnie dostępnych spektrometrów jest wyposażona w układy do prowadzenia pomiarów w szerokim zakresie temperatur.

Sygnał NMR poddawany jest wzmocnieniu i następnie, po przejściu przez przetwornik analogowo-cyfrowy, zapisywany w pamięci komputera. Sygnał FID, będący zależnością napięcia na cewce od czasu, jest następnie poddawany transformacji Fouriera. Operacja ta daje wynik w postaci widma NMR.

2.1.7 Zależność hydratacyjna sygnału ^1H NMR

Dla próbek, w których zachodzi jedynie zjawisko adsorpcji molekuł do powierzchni zależność hydratacyjna L/S jest liniowa. Nadwyżka w mobilnej składowej sygnału może być spowodowana obecnością stałej frakcji rozpuszczalnej w wodzie, która rozpuszcza się wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki. Komponenty sygnału: cieczowy L i stały S można opisać wówczas następującym modelem [Harańczyk et al. 1999]:

(55)

$$L = \alpha_{H_2O} \rho_{H_2O} \Delta m + \alpha_{cd} \rho_c m_{cd}$$

(56)

$$S = S_0 - \alpha_{cu} \rho_c m_{cd}$$

(57)

$$S_0 = \alpha_S \rho_S m_0$$

gdzie: Δm to masa związanej wody, $m_{cd} = (c_s/(1 - c_s))\Delta m$ to masa rozpuszczonej frakcji stałej, gdzie c_s to stężenie nasyceniowe frakcji rozpuszczalnej, α_{H_2O} , α_{cu} , α_{Cu} to współczynniki proporcjonalności opisujące efektywny udział danej puli protonowej w całkowitym sygnale odpowiednio: dla wody, części matrycy rozpuszczalnej w wodzie i dla ciała stałego; ρ_{H_2O} i ρ_c to gęstości protonowe dla wody i rozpuszczonej w wodzie frakcji stałej, ρ_S to uśredniona gęstość protonowa dla matrycy stałej plechy; m_0 to masa matrycy stałej plechy (i przy nieobecności wody zapuławkowanej w porach jest równa suchej masie próbki).

W oparciu o powyższe wzory stosunek wyznaczonych amplitud L/S można zapisać w postaci:

(58)

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

gdzie definiujemy współczynniki: $k = \frac{\alpha_L \rho_L}{\alpha_S \rho_S}$, $\gamma = \frac{\rho_c}{\rho_{H_2O}}$, $\delta = \frac{\rho_S}{\rho_{H_2O}}$.

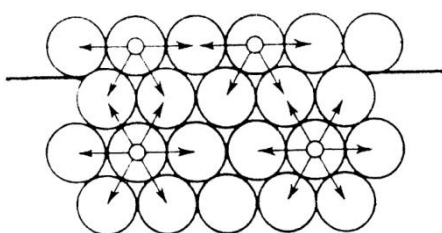
Dla próbek, w których nie występuje pula wody zapuławkowana w porach matrycy stałej, a w których daje się wyróżnić dwa rodzaje sygnału: L_1 od wody ściśle związanej oraz L_2 od wody luźno związanej stosunek amplitud $L_1/(L_1 + L_2)$ wyraża się równaniem:

$$\frac{L}{L_1 + L_2} = \frac{m_1}{m_1 + \left(1 + \gamma \frac{c_s}{1 - c_s}\right) \cdot \Delta m_2}$$

gdzie: m_1 to masa wody wysycająca pulę wody ściśle związanej, $\Delta m_2 = \Delta m - \Delta m_1$

2.2 Adsorpcja. Modele izoterm sorpcyjnej

Adsorpcja fizyczna (zwana również fizysorpcją) jest procesem zachodzącym na granicy faz. Cząsteczki absorbentu wiązane są na powierzchni absorbentu za pomocą słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, najczęściej wiązań wodorowych lub oddziaływań Van der Waalsa. Cząsteczki absorbentu znajdujące się na powierzchni posiadają dodatkową energię, tzw. energię powierzchniową. Związane z nią siły powierzchniowe są równoważone od strony absorbentu, a od strony absorbentu oddziałują z jego cząsteczkami powodując ich gromadzenie się na powierzchni [Sarbak, 2000]. Przykładowo kiedy ciało stałe i gaz są ze sobą w kontakcie, wówczas nieskompensowane oddziaływania na granicy faz mogą zostać wysycane przez samorzutne gromadzenie się na powierzchni molekuł gazu.



Rys. 7 Warstwa powierzchniowa na granicy faz [Sarbak, 2000]

W przypadku adsorpcji zachodzącej na granicy faz: para wodna – ciało stałe cząsteczki wody mogą wiązać się w sposób odwracalny do powierzchni ciała stałego za pomocą wiązań wodorowych. Taki proces ilościowo można opisać za pomocą izoterm

sorpcyjnej, czyli zależności ilości wody związanej przez powierzchnię w funkcji względnej wilgotności otoczenia. Analiza izotermy sorpcyjnej układu może dostarczyć informacji na temat liczby niezwiązanych miejsc na powierzchni, hydrofilowości próbki, powstawania klastrów. Proces fizysorpcji zależy od rodzaju adsorbentu i adsorbentu oraz od warunków, w jakich proces zachodzi. Eksperymentalne izotermy sorpcji mogą przyjmować różny kształt, a mechanizm procesu sorpcji może być wyjaśniony w oparciu o kilka modeli. W dalszej części pracy przedstawiono trzy z nich: modele Langmuira, BET, GAB czyli Denta

Historycznie pierwszy model został opracowany Langmuira na początku XX wieku. Opis Langmuira zakłada występowanie na powierzchni adsorbentu skończonej liczby tzw. pierwotnych miejsc wiążących - do każdego z nich może związać się dokładnie jedna molekula (zakłada zatem sorpcję monowarstwową). Siła oddziaływania jest na tyle duża, że adsorbowane cząsteczki nie mogą poruszać się po powierzchni, dodatkowo wyklucza się możliwość oddziaływania molekuł wody między sobą. Zakłada się dynamiczną równowagę pomiędzy procesem adsorpcji i desorpcji. Taki model opisuje lokalną, jednowarstwową adsorpcję na jednorodnej powierzchni. Równanie izotermy Langmuira przyjmuje postać [Langmuir, 1918]:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 a_w}{(1 + b_1 a_w)}, \quad (60)$$

gdzie: $\Delta m/m_0$ to względny przyrost masy wody zaadsorbowanej wyrażony w jednostkach suchej masy m_0 , ΔM to masa wody związanej do wszystkich miejsc wiążących na powierzchni, b_1 to współczynnik związany z ciepłem adsorpcji, a a_w to względna wilgotność otoczenia wyrażona ułamkiem. Zgodnie z izotermą Langmuira, ilość adsorbentu przylegającego do powierzchni adsorbentu rośnie proporcjonalnie do iloczynu stężenia adsorbentu w fazie gazowej lub ciekłej oraz pojemności adsorpcyjnej. Istnieje jednak granica, po której dalszy wzrost stężenia adsorbentu nie prowadzi już do wzrostu ilości adsorbentu wiążącego się do powierzchni.

Zwykle izotermy sorpcyjne są z powodzeniem opisywane przez model Langmuir'a jedynie dla niskich wartości wilgotności względnej, tzn. dla $a_w \leq 0.1$.

Brunauer, Emmett i Teller rozwinęli teorię Langmuira, dodając do opisu procesu możliwość wiązania molekuł nie tylko do wolnych miejsc wiążących na powierzchni adsorbentu, ale także do związanych uprzednio molekuł wody (adsorpcja wielowarstwowa). Zaproponowali oni nową izotermę (zwaną izotermą BET) , która opisuje wielowarstwową, sekwencyjną adsorpcję i jest opisana równaniem [Brunauer, Emmett, Teller, 1938]:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 a_w}{(1 - a_w)(1 + b_1 a_w - a_w)}, \quad (61)$$

wielkości występujące w równaniu zdefiniowano powyżej (patrz (42)).

Model BET dobrze opisuje zjawisko w zakresie wilgotności względnych z przedziału 0.05-0.3 [Sarbak, 2000].

Wzór (61) można przekształcić do postaci parabolicznej otrzymując:

$$\frac{a_w}{\Delta m/m_0} = A + (B - A)a_w - B a_w^2, \quad (62)$$

gdzie:

$$A = \frac{1}{b_1 \frac{\Delta M}{m_0}}, \quad B = \frac{b_1 - 1}{b_1 \frac{\Delta M}{m_0}}. \quad (63)$$

Dla $a_w = 1$ parabola BET (62) przyjmuje wartość zero (miejsce zerowe).

Bardziej ogólny model opisujący zjawisko fizysorpcji zaproponował Dent. Model Denta (zwany także pod nazwą modelu GAB od nazwisk: Guggenheim, Anderson, de Boer) także zakłada dwa rodzaje miejsc wiążących: pierwotne miejsca na powierzchni oraz miejsca wtórne, na już przyłączonych molekułach wody. W modelu definiuje się następujące stałe; C_0 to stała szybkości odłączania molekuł z pierwotnych miejsc wiążących, C to stała szybkości ucieczki z kolejnych warstw.

Izoterma Denta przyjmuje postać [Dent, 1977]:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 a_w}{(1 - b a_w)(1 + b_1 a_w - b a_w)} \quad (64)$$

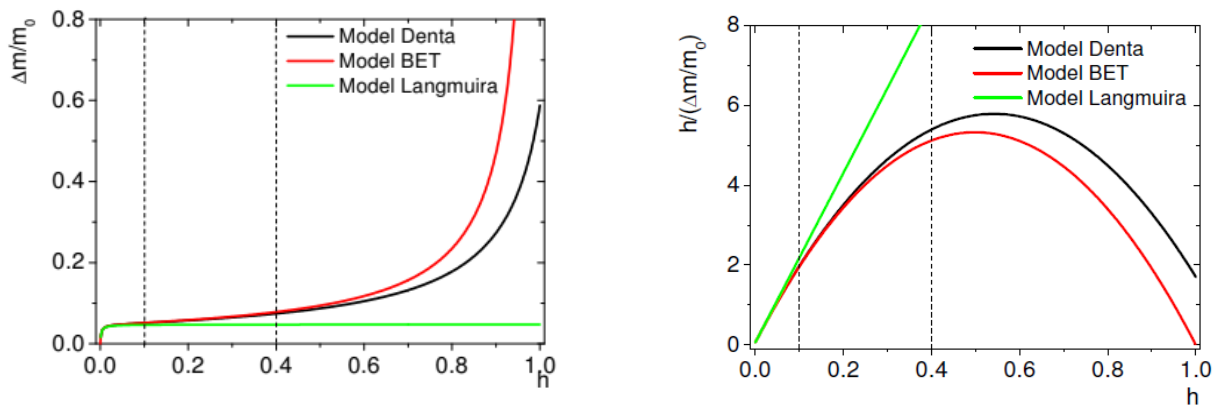
gdzie $b_1 = (a/C_0)p_0$ określa względne pokrycie pierwotnych miejsc wiążących dla danej wilgotności względnej, $b = (a/C)p_0$ i określa względne pokrycie n -tej warstwy w stosunku do pokrycia warstwy $(n-1)$ -szej, a to stała szybkości przyłączania cząsteczek wody na jednostkę ciśnienia. W modelu Denta stała b może przyjmować wartości z przedziału $[0,1]$ (model BET zakłada stałą wartość b równą 1).

W postaci parabolicznej wzór (46) przyjmuje postać:

$$\frac{a_w}{\Delta m/m_0} = A' + B' a_w - C' a_w^2, \quad (65)$$

gdzie zachodzą związki:

$$b = \frac{\sqrt{B'^2 + 4A'C'} - B'}{2A'}, \quad b_1 = \frac{B'}{A'} + 2b, \quad \frac{\Delta M}{m_0} = \frac{1}{A'b} \quad (66)$$



Rys. 8 Porównanie modeli teoretycznych izoterm sorpcji, z prawej przedstawiona postać sigmaoidalna, z lewej paraboliczna. Kolorem zielonym zaznaczono model, kolorem czarnym zaznaczono model GAB (Denta), kolorem czerwonym zaznaczono model BET.

2.3 Kinetyka hydratacji

Informacji na temat sposobu wiązania wody w układzie dostarczyć może również badanie kinetyki hydratacji, czyli przyrostu względnej zawartości wody w próbce w funkcji czasu. Zjawisko można porównać do procesu aktywacyjnego, stąd zależność można przybliżyć poprzez jedną funkcję eksponencjalną lub przez sumę wielu funkcji eksponencjalnych:

$$\frac{\Delta m(t)}{m_0} = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i (1 - \exp(-t/t_i)), \quad (67)$$

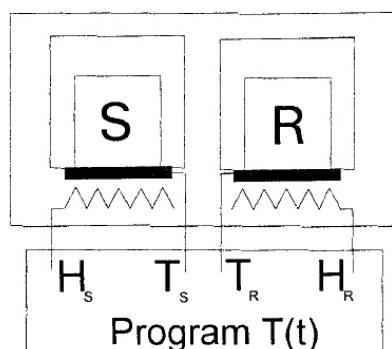
gdzie $\frac{\Delta m(t)}{m_0}$ to poziom uwodnienia próbki, t_i to czas hydratacji próbki, natomiast A_0 i A_i to odpowiednio początkowe uwodnienie próbki i przyrost poziomu uwodnienia dla ustalonej wilgotności względnej, wyrażone w jednostkach suchej masy próbki, $\Delta m/m_0$.

2.4 Skaningowa kalorymetria różnicowa DSC

Skaningowa kalorymetria różnicowa DSC (ang. *Differential Scanning Calorimetry*) jest techniką termoanalityczną, umożliwiającą pomiar temperatur przejść fazowych oraz wyznaczenie wartości entalpii tych przejść. Podczas badania DSC narastająca/obniżana temperatura próbki i wzorca utrzymywane są na tym samym poziomie. Rejestruje się zmianę szybkości przepływu ciepła w funkcji temperatury. Jeśli w badanej próbce zachodzą przemiany fizyczne (w szczególności przejścia fazowe) wówczas tempo dostarczania ciepła do próbki będzie inne, niż do wzorca (wymaga się, żeby dla odnośnika nie zachodziły przemiany fazowe w badanym zakresie temperatur).

Standardowy kalorymetr DSC składa się z dwóch takich samych komór: pomiarowej i referencyjnej, które są odizolowane termicznie od otoczenia (Rys.9). Każda z nich jest wyposażona w grzałkę i termometr oporowy. W komorze pomiarowej umieszcza się

naczynko z badaną próbką, a w komorze referencyjnej naczynko z materiałem wzorca (lub pozostawia się komorę pustą).



Rys.9 Schemat standardowego kalorymetru DSC.

S – komora z próbką, R – komora wzorca, H_S i H_R to grzałki, T_S i T_R to termopary [Wróbel i Marzec, 2006]

W czasie pomiaru komory są ogrzewane w taki sposób, aby zachowana była równość ich temperatur. Z uwagi na różnice w pojemności cieplnej próbki i wzorca, moc cieplna dostarczana do materiału wzorca różni się od mocy dostarczanej do próbki. Wynikiem pomiarów jest krzywa DSC, która przedstawia różnicę mocy cieplnej dostarczanej do grzałek w zależności od temperatury. Jeśli procesom zachodzącym w próbce towarzyszy emisja lub pochłanianie ciepła, to wówczas na krzywej kalorymetrycznej obserwuje się maksimum lub minimum. Entalpię przejścia ΔH można wyliczyć za pomocą zależności:

$$\Delta H = k \cdot A, \quad (68)$$

gdzie: A jest powierzchnią pod pikiem minimum lub maksimum, a k to współczynnik proporcjonalności, wyznaczony w oparciu o analizę próbki o znanych entalpiach przejść.

Pomiary kalorymetryczne metodą DSC zostały wykonane z wykorzystaniem różnicowego kalorymetru skaningowego Perkin-Elmerpyris Pyrys DSC w laboratorium Zakładu Inżynierii Nowych Materiałów Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Przygotowanie próbek

Próbki grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra* pochodzą z siedliska Mount Wawel w okolicy Polskiej Stacji Antarktycznej im. Henryka Arctowskiego (62°09'41''S, 58°28'10''W) na Wyspie Króla Jerzego w Archipelagu Szetlandów Południowych. Próbki zostały zebrane i oznaczone przez Profesor Marię A. Olech w styczniu 2002 roku podczas Polskiej Ekspedycji Antarktycznej PAN. Od tego czasu do chwili rozpoczęcia pomiarów (2017 rok) były przechowywane w stanie powietrznie suchym w zielniku Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego w atmosferze o wilgotności względnej około 30%, w temperaturze pokojowej.

Poziom uwodnienia próbki zdefiniowano jako iloraz przyrostu masy Δm i suchej masy m_0 , przy czym suchą masę zmierzono po wygrzewaniu próbki w temperaturze 70°C przez 72h w wagosuszarce RADWAG MA 60.3Y. Przez wzgląd na ryzyko dekompozycji substancji organicznych w próbkach nie stosowano przy wygrzewaniu wyższych temperatur [Gaff, 1977]. Wyznaczony w ten sposób poziom uwodnienia próbki powietrznie suchej wynosi $\Delta m/m_0 = 0.0928 \pm 0.0034$.

Pomiary zmiany masy próbek przeprowadzono metodą grawimetryczną przy użyciu elektronicznej wagi laboratoryjnej RADWAG WAX 110, z dokładnością odczytu 0.00001g.

Proces dehydratacji zbadano umieszczając próbki w ekсыkatorze nad żelazem krzemionkowym SiO₂, w atmosferze o wilgotności względnej około 0% i w temperaturze pokojowej.

Powietrznie suche plechy porostów zostały rozdrobnione, a następnie uwodniane w atmosferach o różnej wilgotności. Pomiary kinetyki hydratacji prowadzono dodatkowo dla oddzielonych części plechy – owocników oraz łądyżek, a także dla fragmentów całej plechy. W badaniu procesu hydratacji z fazy gazowej umieszczono próbki w eksykatorach o atmosferach o różnych wilgotnościach względnych. W Tabeli 2 zestawiono wartości wilgotności względnej atmosfer nad wodą destylowaną oraz nad nasyconymi roztworami soli. Przed rozpoczęciem, uwadniania próbki były inkubowane przez około 120 h nad żelem krzemionkowym, w środowisku o wilgotności względnej 0%.

Tabela 2. Zestawienie wilgotności względnych nad powierzchniami przesyconych roztworów wybranych substancji.

Roztwór	Wilgotność względna	Roztwór	Wilgotność względna
LiCl	11%	NH ₄ NO ₃	63%
KC ₂ H ₃ O ₂	23%	Na ₂ S ₂ O ₃	76%
CaCl	32%	K ₂ CrO ₃	88%
K ₂ CO ₃	44%	Na ₂ SO ₄	93%
Na ₂ Cr ₂ O ₇	52%	H ₂ O	100%

3.2 Spektroskopia ¹H-NMR

Widma ¹H-NMR zostały zmierzone przy użyciu spektrometru Bruker Avance III z serii Bruker Biospin z magnesem nadprzewodzącym wytwarzającym pole magnetyczne o indukcji $B_0 = 7$ T, co odpowiada częstotliwości rezonansowej 300 MHz dla protonów, z impulsem $\pi/2$ o długości 2.2 μ s i czasem repetycji równym 2s. Pojedyncze widma zebrano dla próbek o różnych poziomach uwodnienia z przedziału 9% - 67%. Próbki przeznaczone do pomiarów techniką NMR były uwadniane w dedykowanych do spektrometru szklanych probówkach w eksykatorze nad powierzchnią wody (wilgotność względna atmosfery 100%), aż do uzyskania żadanego poziomu uwodnienia.

W celu zbadania czasu relaksacji spin-sieć T_1 przeprowadzono rejestrację widm z użyciem sekwencji IR (ang. *Inversion recovery*, w polskim piśmiennictwie znanej pod nazwą metody inwersyjnej). Składa się ona z sekwencji impulsów π oraz $\pi/2$ opóźnionych o czas τ .

Początkowy impuls π obraca wektor magnetyzacji próbki w kierunku $-\mathbf{B}_0$. Dzięki procesowi relaksacji spin-sieć wektor magnetyzacji odrasta przez wszystkie pośrednie wartości wzdłuż kierunku $\mathbf{B}_0$. Poszczególne wartości jesteśmy w stanie rejestrować dzięki zastosowaniu kolejnych impulsów $\pi/2$, które obracają wektor magnetyzacji na płaszczyznę XY.

3.3 Relaksometria $^1\text{H-NMR}$

Badania $^1\text{H-NMR}$ w domenie czasu zostały przeprowadzone przy użyciu spektrometru impulsowego WNS HB65 skonstruowanego przez Waterloo NMR Spectrometers z elektromagnesem wytwarzającym pole magnetyczne o indukcji 0.7 T, co odpowiada częstotliwości rezonansowej 30 MHz dla protonów. Stosowano impulsy $\pi/2$ o długości $1.25 \mu\text{s}$ i czasem repetycji równy 5s, pomiar był złożeniem 700 akwizycji. Zebrano wyniki dla próbek o różnych poziomach uwodnienia z przedziału 2% - 86%. Badano dwie próbki pochodzące z okolic Polskiej Stacji Antarktycznej im. Henryka Arctowskiego zebrane: jedna w 2002 roku, druga w 2009 roku. Podobnie jak w przypadku pomiarów w domenie częstotliwości próbki przeznaczone do pomiarów techniką NMR były uwadniane w dedykowanych do spektrometru szklanych probówkach w eksykatorze nad wodą. Dane uzyskane z pomiarów $^1\text{H-NMR}$ w domenie czasu i w domenie częstotliwości opracowano w programie Origin 9.1 oraz w jego wersji OriginPro 2023. Program umożliwia dopasowanie do wyników dowolnie zdefiniowanej przez użytkownika funkcji. W poszukiwaniu optymalnych parametrów dopasowania program wykorzystuje iteracyjny algorytm Lavenberga-Marquardta. W ogólności algorytm ten dla serii danych $(t_i, y_i) \in \mathbb{R}^2$, gdzie $i=1,2,\dots,N$ daje dopasowanie $f(t_i|p)$ minimalizujące funkcjonal χ^2 :

$$\chi^2(f) = \sum_{i=1}^N [y_i - f(t_i|p)]^2. \quad (69)$$

Dane uzyskane w eksperymencie $^1\text{H-NMR}$ w domenie czasu opracowano w programie CracSpin [Węglarz, Harańczyk 2000], który również wykorzystuje wyżej opisany algorytm Lavenberga-Marquardta.

4. WYNIKI

4.1 Kinetyka hydratacji

Zbadano proces hydratacji próbek z fazy gazowej w kontrolowanej wilgotności względnej powietrza nad nasyconymi roztworami: LiCl ($p/p_0=11\%$), $KC_2H_3O_2$ ($p/p_0=23\%$), CaCl ($p/p_0=32\%$), K_2CO_3 ($p/p_0=44\%$), $Na_2Cr_2O_7$ ($p/p_0=52\%$), NH_4NO_3 ($p/p_0=63\%$), $Na_2S_2O_3$ ($p/p_0=76\%$), K_2CrO_3 ($p/p_0=88\%$), Na_2SO_4 ($p/p_0=93\%$) i nad powierzchnią wody ($p/p_0=100\%$). Eksperyment prowadzono dla trzech rodzajów próbek: i) dla oddzielonych od plechy owocników, ii) dla fragmentów łożyszek pobranych z plechy *U. aurantiaco-atra*, iii) dla plechy nie poddanej fragmentaryzacji. Trasy hydratacyjne rejestrowano dla około 160 h.

Do wykresów tras hydratacyjnych $\Delta m(t)/m_0$ dla niskich i średnich wilgotności (tj. z przedziału 11%-76%) dopasowano funkcję jednoeksponencjalną:

(70)

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

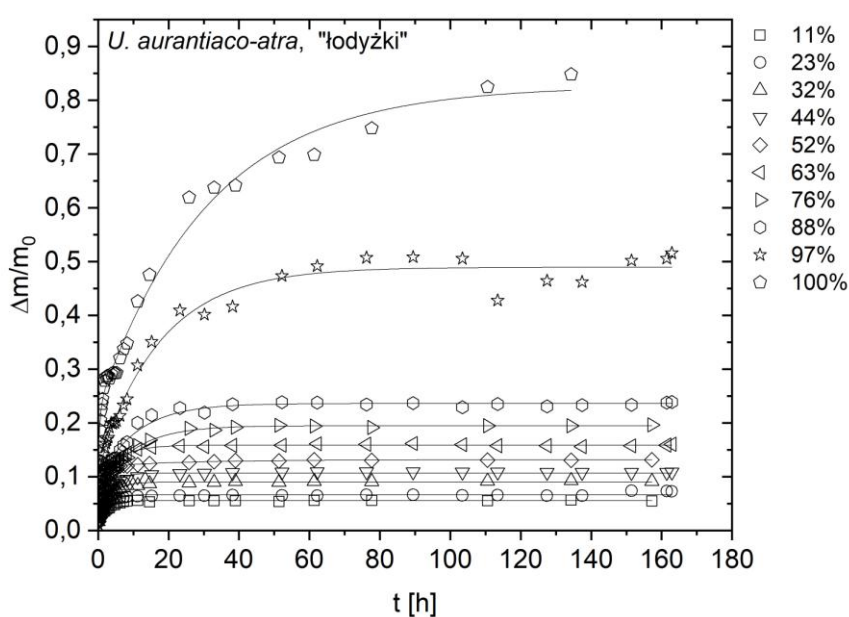
gdzie $\Delta m/m_0$ jest względnym przyrostem masy, A_0^h jest poziomem hydratacji dla względnej wilgotności 0% nad żelem krzemionkowym i odnosi się do frakcji wody ściśle związanej, A_1^h jest nasyceniowym poziomem hydratacji dla składowej, t_1^h jest czasem hydratacji.

Dla wyższych wilgotności względnych otoczenia (tj. z przedziału 88% - 100%) i dla wszystkich trzech rodzajów badanych próbek wykryto drugą, wolniejszą składową i w tym przypadku lepsze dopasowanie uzyskano dla funkcji będącej superpozycją dwu eksponent:

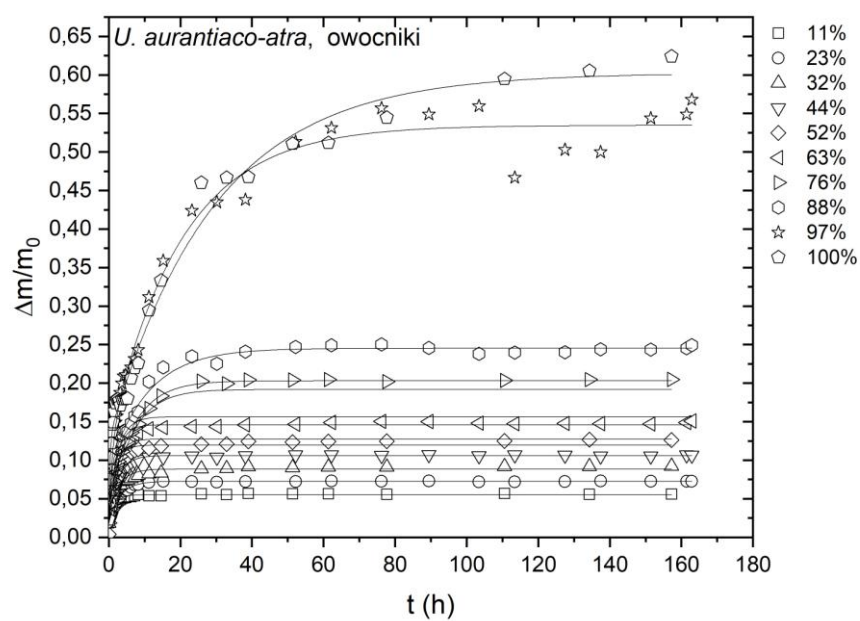
(71)

$$\Delta m(t)/m_0 = A_0^h + A_1^h \cdot [1 - \exp(-t/t_1^h)] + A_2^h \cdot [1 - \exp(-t/t_2^h)]$$

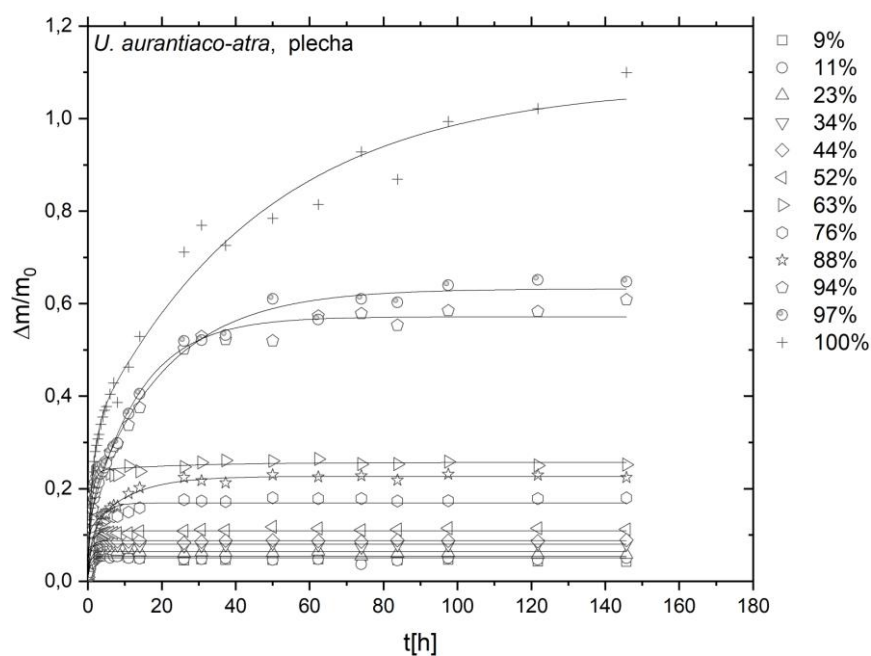
gdzie A_2^h i t_2^h to odpowiednio nasyceniowy poziom hydratacji oraz czas hydratacji dla drugiej, wolniejszej składowej.



Rys. 10 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej próbek złożonych z „lodyżek” plechy *Usnea aurantiaco-atra* dla różnych próbek hydratowanych w atmosferach o różnych wilgotnościach względnych.



Rys. 11 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej różnych próbek owocników *Usnea aurantiaco-atra* próbek hydratowanych w atmosferach o różnych wilgotnościach względnych.



Rys. 12 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej różnych próbek całej plechy *Usnea aurantiaco-atra* hydratowanych w atmosferach o różnych wilgotnościach względnych.

W próbkach grzybów zlichenizowanych można wyróżnić frakcje wody związanej ze względu na ich bliskość do powierzchni plechy, a tym samym na podstawie ich ruchliwości molekularnej. W badanym układzie, dla wyższych uwodnień udało się wyodrębnić trzy frakcje wody, tj. najściślej związaną do powierzchni, nieusuwalną nawet przy inkubacji nad żelem krzemionkowym, wodę ściśle związaną oraz wodę luźno związaną.

Tabela 3. Porównanie uśrednionych parametrów kinetyki hydratacji dla badanych części plechy

	A_0^h	A_1^h	t_1^h [h]
<i>U. a-a</i> łodyżki	$0,024 \pm 0,005$	$0,104 \pm 0,002$	$2,623 \pm 0,820$
<i>U. a-a</i> owocniki	$0,033 \pm 0,020$	$0,100 \pm 0,002$	$2,696 \pm 0,992$
<i>U. a-a</i> plecha	$0,027 \pm 0,009$	$0,111 \pm 0,023$	$1,015 \pm 0,632$

Poziom hydratacji nad żelem krzemionkowym A_0^h jest niezerowy i wynosi odpowiednio: i) $0,024 \pm 0,005$ dla fragmentów „łodyżek”; ii) $0,033 \pm 0,020$ dla owocników; iii) $0,027 \pm 0,009$ dla fragmentów całej plechy. Kinetyka dehydratacji została dobrze dopasowana modelem jednoeksponencjalnym. Uśredniona wartość parametru A_0^h była równa $0,026 \pm 0,002$. Uzyskano wyniki nieco niższe niż dla innych antarktycznych grzybów zlichenizowanych. Przykładowo dla innych porostów z rodzaju *Usnea*, na przykład dla krzaczkowatej plechy *Usnea antarctica* obecność frakcji wody najściślej związanej była wyższa: $A_0^h = 0.040 \pm 0.011$, [Harańczyk et al., 2006]. Natomiast dla gatunku *Umbilcaria antarctica* wyniosła $A_0^h = 0.101 \pm 0.018$ [Harańczyk, 2003]. Różnice w wartości parametru mogą świadczyć o zróżnicowaniu gęstości miejsc wiążących wodę na powierzchniach różnych gatunków porostów.

Badane fragmenty plechy nieznacznie różnią się kinetyką hydratacji fazy gazowej (Tabela 3). Dla łodyżek uśredniony czas hydratacji dla frakcji wody ściśle związanej wynosi $t_1^h = (2,623 \pm 0,820)$ h, natomiast dla owocników czas ten jest zgodny w granicy niepewności pomiarowej i wynosi $(2,696 \pm 0,992)$ h. Czas hydratacji dla fragmentów całej plechy wyniósł $(1,015 \pm 0,632)$ h. Udział frakcji wody ściśle związanej, wyrażony w jednostkach suchej masy, m_0 , dla łodyżek wynosi $A_1^h = 0.104 \pm 0.002$, a dla owocników wynosi $0,100 \pm 0,002$

oraz 0.111 ± 0.023 dla fragmentów całej plechy – uzyskano zatem wartości zbliżone. Dla porównania wartość amplitudy frakcji wody ściśle związanej w plesze krzaczkowatej *Usnea antarctica* była bardzo podobna i wyniosła 0.087 ± 0.028 [Harańczyk et al., 2006], dla gatunku *Umbilicaria antarctica* uzyskano wartość $A_1^h = 0.082 \pm 0.006$ [Harańczyk, Kijak et al., 2021]. Po nasyceniu frakcji wody silnie związanej, wraz z dalszym wzrostem wilgotności atmosfery pojawia się kolejna frakcja wody związanej o dłuższym czasie hydratacji.

Suma składowych: $A_0^h + A_1^h + A_2^h + \dots$ niesie informację o całkowitym równowagowym poziomie uwodnienia próbki.

Analiza kinetyki hydratacji pokazuje różnice w procesie wiązania frakcji wody luźno związanej. Przy wilgotności względnej $h = 100\%$ poziom hydratacji całkowitej C_h dla łądzynek wynosi 0,826, natomiast dla owocników jest niższy i wynosi 0,602. Wraz ze wzrostem wilgotności atmosfery przebiegi hydratacji z fazy gazowej wykazują zmianę zachowania obu rodzajów próbek. Stopień hydratacji całkowitej wzrasta gwałtownie dla wilgotności względnej przekraczającej określony poziom, tj. dla owocników poziom hydratacji całkowitej, C_h , aż do wilgotności względnej $h = 88\%$ nie przekracza 0,25 a przy $h = 97\%$ wzrasta ponad dwukrotnie, osiągając ok. 0,53 (wartość maksymalna 0,6 przy $h = 100\%$). Dla fragmentów „łądzynek” w wilgotności względnej $h = 100\%$ poziom uwodnienia całkowitego, C_h , wzrasta znacznie bardziej osiągając wartość 0,83. Przebieg krzywych hydratacji dla fragmentów całej plechy przypomina ten dla łądzynek, co może wynikać z małego udziału masowego owocników w plesze grzyba zlichenizowanego.

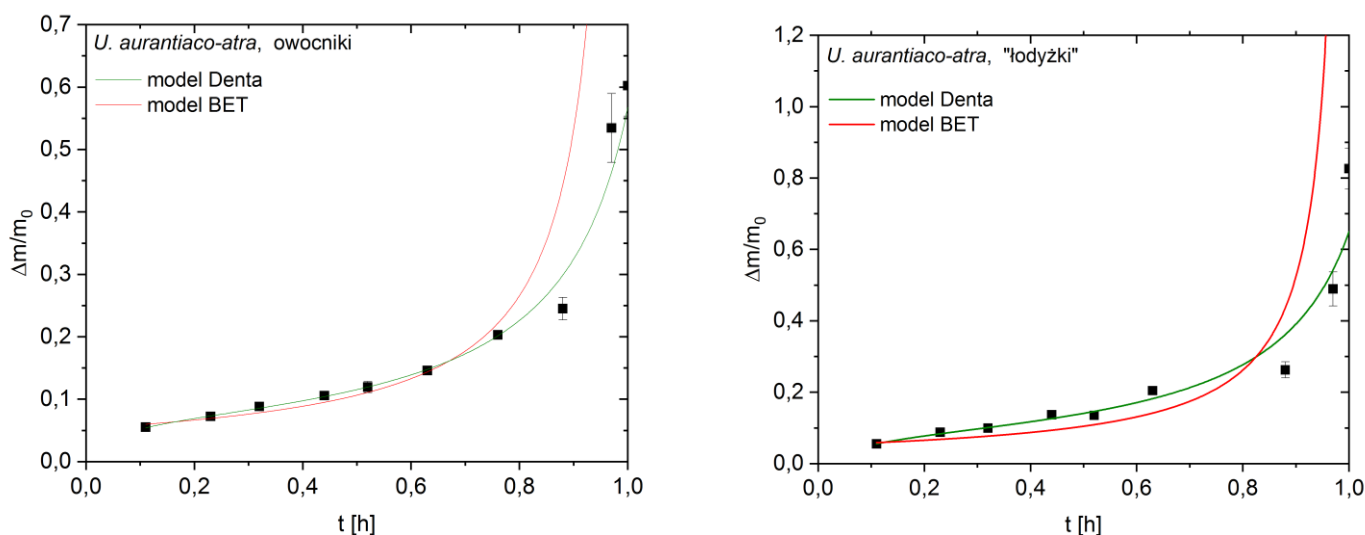
Tabela 4. Parametry dopasowania modelu jedno- oraz modelu dwueksponencjalnego dla tras hydratacyjnych zebranych dla badanych próbek plechy *Usnea aurantiaco-atra*: owocników, „łodyżek” i fragmentów całej plechy.

	h	$A_0^h \pm \Delta A_0^h$	$A_1^h \pm \Delta A_1^h$	$t_1^h \pm \Delta t_1^h$ [h]	$A_2^h \pm \Delta A_2^h$	$t_2^h \pm \Delta t_2^h$ [h]
łodyżki	0,11	0,01979±0,001	0,03553±0,001	2,85818 ± 0,106	--	--
	0,23	0,01957±0,002	0,06847±0,002	2,26656±0,164	--	--
	0,32	0,02141±0,001	0,07815±0,001	3,31779±0,114	--	--
	0,44	0,02831±0,002	0,10842±0,002	2,93872±0,169	--	--
	0,52	0,01889±0,002	0,11632±0,0002	1,99328±0,072	--	--
	0,63	0,04004±0,003	0,16434±0,003	2,71104±0,160	--	--
	0,76	0,02746±0,002	0,07659±0,003	6,27875±0,274	--	--
	0,88	0,01307±0,008	0,1033±0,001	0,27758±0,074	0,146±0,005	10,59±0,100
	0,97	0,01563±0,017	0,1033±0,020	0,58513±0,219	0,370±0,012	17,73±1,68
	1,00	0,1248 ±0,020	0,1033±0,020	0,52495±0,215	0,598±0,016	31,26±2,67
owocniki	0,11	0,2141±0,001	0,03385±0,001	1,76895±0,088	--	--
	0,23	0,0188±0,0003	0,05371±0,0003	3,08396±0,042	--	--
	0,32	0,3215±0,003	0,05631±0,003	2,92907±0,031	--	--
	0,44	0,01791±0,001	0,08799±0,001	2,54962±0,045	--	--
	0,52	0,02365±0,004	0,09589±0,005	1,8685±0,183	--	--
	0,63	0,02023±0,002	0,12574±0,002	2,1854±0,077	--	--
	0,76	0,04243±0,003	0,1606±0,003	6,81643±0,361	--	--
	0,88	0,01824±0,006	0,06943±0,007	0,5721±0,117	0,157±0,005	10,703±0,837
	0,97	0,02127±0,017	0,10094±0,020	0,99978±0,442	0,412±0,017	19,84 ± 2,10
	1,00	0,0205±0,0183	0,1074±0,020	0,34237±0,125	0,474±0,011	28,95±2,27
plecha	0,11	0,0015±0,0007	0,0525±0,0073	0,4784±0,1270	--	--
	0,23	0,0046±0,0038	0,0460±0,0038	0,7163±0,1147	--	--
	0,34	0,0118±0,0034	0,05110±0,0034	0,6663±0,0837	--	--
	0,44	0,0107±0,0023	0,0692±0,0023	0,5692±0,0355	--	--
	0,52	0,0162±0,0014	0,0710±0,0024	0,8086±0,0306	--	--
	0,63	0,0189±0,0034	0,0897±0,0034	1,0347±0,0784	--	--
	0,76	0,0169±0,0027	0,1012±0,0036	0,7666±0,0569	0,060 ±0,003	13,35±1,65
	0,88	0,0246±0,0049	0,0824±0,0056	0,3215±0,0483	0,119±0,035	10,47±0,83
	0,97	0,0268±0,0197	0,1328±0,0190	0,9369±0,2846	0,472±0,011	20,78±1,52
	1,00	0,0451±0,0255	0,2678±0,0302	1,4036±0,3733	0,763±0,033	46,41±6,53

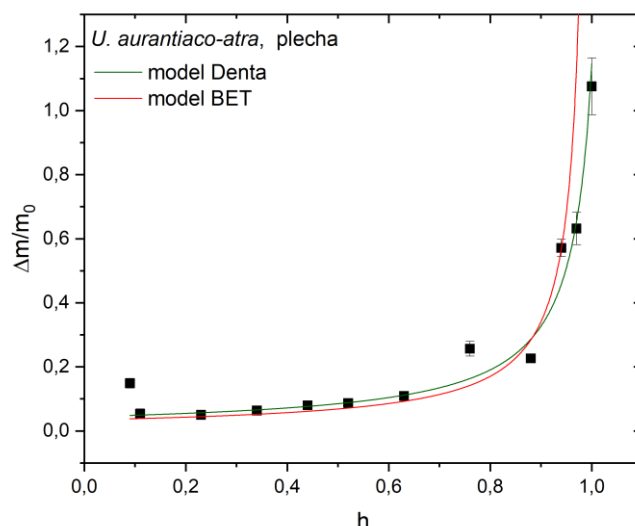
4.2 Izoterma sorpcyjna

Całkowity poziom hydratacji próbki, zdefiniowany jako suma: $A_0^h + A_1^h + A_2^h + \dots$, wykreślono w funkcji wilgotności względnej atmosfery h uzyskując sigmoidalną postać izotermy sorpcyjnej dla badanych próbek. Tego typu postać izotermy zwykle dobrze odwzorowuje zjawisko sorpcji wielowarstwowej, uwzględniającej dwa rodzaje miejsc wiązania wody. Wyróżnia się tzw. pierwotne miejsca wiążące, bezpośrednio związane z powierzchnią badanego układu (w tym przypadku z plechą porostu) oraz tzw. wtórne miejsca wiążące do molekuł wody uprzednio związanej z powierzchnią, lub rzadziej do miejsc na powierzchni ze znacznie mniejszym powinowactwem w przypadku powierzchni bardziej hydrofobowych.

Stosunek liczby miejsc wiążących pokrytych przez liczbę n molekuł wody wyrażony w jednostkach pokrytych przez $n - 1$ molekuł jest równy $b = S_n/S_{n-1} |h=1$. Dla procesów sorpcji wielowarstwowej zwykle rozważa się dwa modele teoretyczne, czyli klasyczny model BET [Brunauer et al. 1938] oraz model Denta (GAB). Dla modelu Denta uzyskano dobrą jakość dopasowania, lepszą, niż w przypadku zastosowania modelu BET (Rys. 13, 14).



Rys. 13 Izotermy sorpcyjne w postaci sigmoidalnej wraz z dopasowanymi modelami: linia zielona – model Denta (GAB), linia czerwona – model BET sporządzone dla izolowanych fragmentów plech a) „łodyżek” b) owocników.



Rys. 14 Izoterma sorpcyjna w postaci sigmoidalnej wraz z dopasowanymi modelami: linia zielona – model Denta (GAB), linia czerwona – model BET sporządzona dla próbek całej plechy

Dla badanego układu uzyskano zbliżone wartości względnej masy wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące $\Delta M/m_0$ dla łodyżek, owocników i dla całej plechy (bez rozróżnienia fragmentów), równe odpowiednio: $0,0616 \pm 0,0067$ dla łodyżek, $0,0680 \pm 0,0021$ dla owocników oraz $0,0540 \pm 0,0046$ dla plechy. Uzyskano wartości wyższe niż wartości A_0^h uzyskane w wyniku analizy kinetyki hydratacji. Dla porównania dla innych zlichenizowanych grzybów o plesze krzaczkowatej uzyskano wartości: dla *Himantormia lugubris* 0.071, a dla *Usnea antarctica* 0.054, dla *Niebla tigrina* 0.07; a dla porostu listkowatego *Umbilicaria antarctica* 0.073 [Harańczyk 2003] [Harańczyk et al., 2006] [Harańczyk et al. 2021]

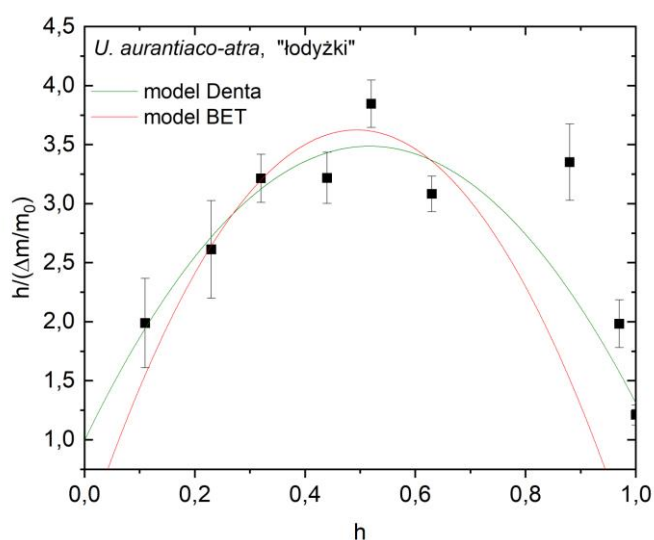
Parametr modelu GAB równy $1/b_1$, jest miarą liczby niezajętych pierwotnych miejsc wiążących przy wilgotności względnej $h = 1$, a więc jest pośrednią miarą hydrofobowości powierzchni. Uzyskano wartość parametru około 0.05 bliską zero, co sugeruje, że powierzchnia plechy *U. aurantiaco-atra* są silnie hydrofilowe. Wartość parametru dla próbki owocników jest jeszcze niższa, 0.02, obarczona jest natomiast względnie dużą niepewnością pomiarową. Było to spowodowane problemami numerycznymi w dopasowaniu parametrów modelu. Biorąc pod uwagę przebieg kinetyki hydratacji owocników (rozdz. 4.1), nie można stwierdzić podwyższonej hydrofilowości owocników w porównaniu do całej plechy.

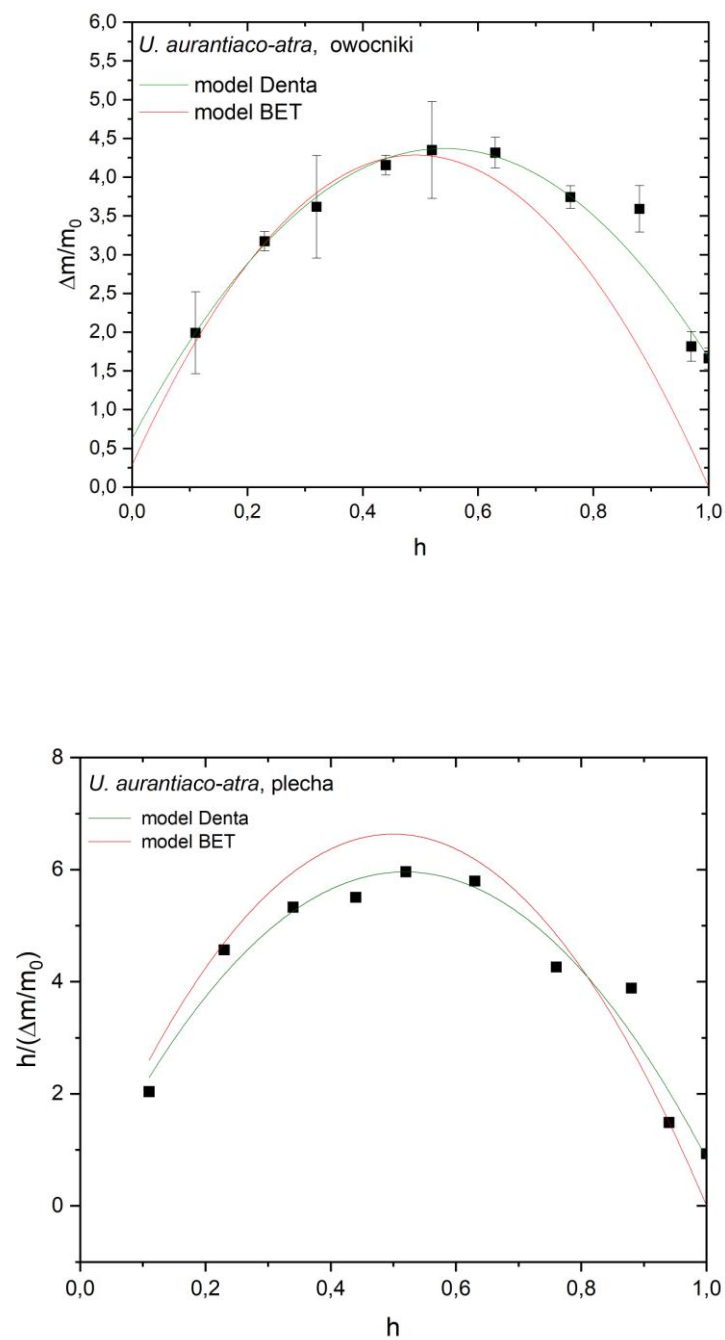
Parametr b dla modelu GAB opisuje tendencję tworzenia się kropeł w przebiegu hydratacji i wynosi $b = 0,90(12)$, $0,88(13)$ i $0,963(78)$ odpowiednio dla „łodyżek”, dla owocników i dla plechy. Podobną wartość otrzymano dla grzyba zlichenizowanego *Usnea antarctica*, dla której jest równy $b = 0,908(29)$. [Harańczyk et. al., 2021]

Tabela 5. Porównanie parametrów dopasowania modelu Denta dla wyróżnionych części plechy (łodyżki i owocniki)

Parametr		Łodyżki	Owocniki	Plecha
Model Denta - postać sigmoidalna	b	$0,9010 \pm 0,0118$	$0,8810 \pm 0,0126$	$0,9627 \pm 0,0078$
	$1/b_1$	$0,0182 \pm 0,0631$	$0,0479 \pm 0,0097$	$0,0045 \pm 0,082$
	$\Delta M/m_0$	$0,0616 \pm 0,0067$	$0,0680 \pm 0,0021$	$0,0540 \pm 0,0046$
Model Denta - postać paraboliczna	A	$0,9942 \pm 0,8278$	$0,6262 \pm 0,2980$	$0,05493 \pm 0,5528$
	B	$9,6388 \pm 2,7912$	$13,8440 \pm 1,1385$	$22,7590 \pm 2,2061$
	C	$9,3213 \pm 2,0530$	$12,8028 \pm 0,9133$	$21,9436 \pm 1,8491$

W celu przetestowania trafności zastosowanego modelu, izoterma sorpcji jest zwykle przedstawiana w postaci parabolicznej (65). Dla modelu BET parametr $b = 1$ z definicji. Oznacza to, że dla uwadnianych układów, w których sorpcja wielowarstwowa jest dokładnie opisana przez model BET, paraboliczna postać izotermy sorpcji jest równa zero dla wilgotności względnej $h = 1$. Nadwyżka tej wartości nad 0 dla $h = 1$ jest miarą stosowalności modelu Denta (GAB). Dla wszystkich zmierzonych próbek plechy wartość $h/(\Delta m/m_0)$ znacznie przekracza zero dla $h = 1$, co pokazuje, że proces rehydratacji z fazy gazowej grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra* jest znacznie lepiej opisany przez model Denta aniżeli przez model BET.





Rys. 15 Izoterma sorpcyjne w postaci sigmoidalnej wraz z dopasowanymi modelami: linia zielona – model Denta (GAB), linia czerwona – model BET sporządzona dla a) "łodyżek" b) dla owocników c) dla próbek całej plechy.

4.3 Zależności hydratacyjne widm ^1H -NMR

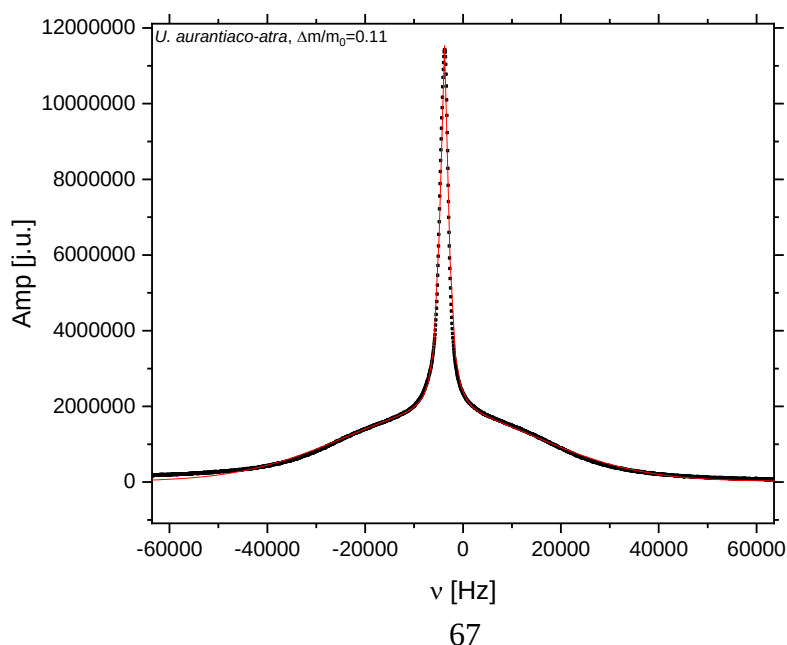
Zmierzono widma ^1H -NMR plech w szerokim zakresie poziomów hydratacji od $\Delta m/m_0 = 0.08$ do $\Delta m(t)/m_0 = 0.67$. Przykładowe widma dla trzech wybranych, znacznie różniących się poziomów hydratacji przedstawiono na Rys 15.

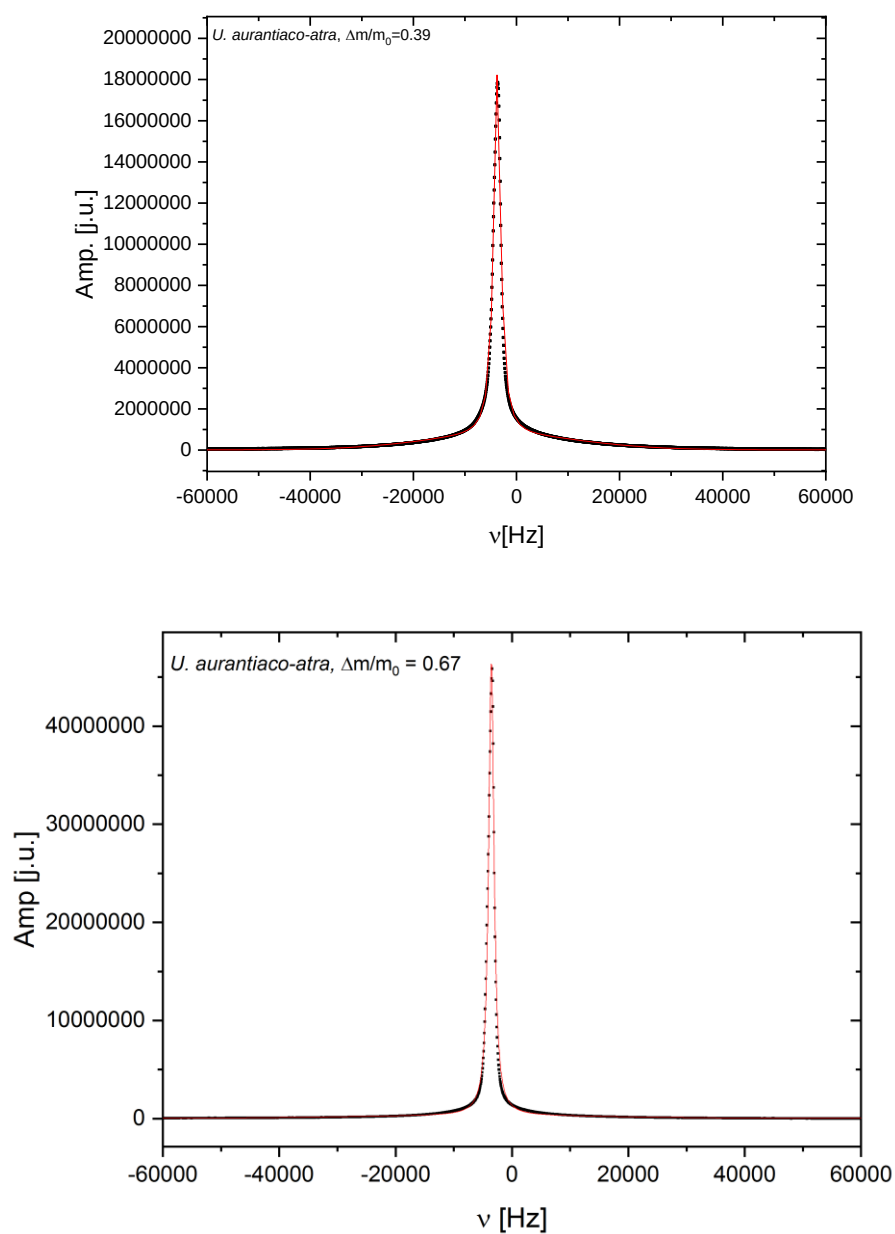
Zmierzony sygnał może być zdekomponowany jako szeroka linia Gaussa o polu powierzchni A_S pochodząca od częściowo unieruchomionych protonów budujących matrycę stałą próbki oraz wąska linia Lorentza o polu powierzchni A_L pochodząca od protonów mobilnych zawartych w próbce, najprawdopodobniej od uśrednionych frakcji wody związanej w plesze oraz częściowo od frakcji lipidowej. Zarejestrowane widma opisano superpozycją funkcji Gaussa oraz funkcji Lorentza, według wzoru:

(72)

$$A(\nu) = y_0 + \frac{A_S}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_S} \exp \left[-2 \cdot \left(\frac{\nu - \nu_S}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_S} \right)^2 \right] + \frac{2A_L}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_L}{4(\nu - \nu_L)^2 + (\Delta \nu_L)^2} \right]$$

gdzie $\Delta \nu_G$, $\Delta \nu_L$ – szerokości połówkowe linii Gaussa i Lorentza; ν_G , ν_L – położenia pików linii Gaussa i Lorentza, y_0 to stała składowa sygnału (efekt temperaturowy).





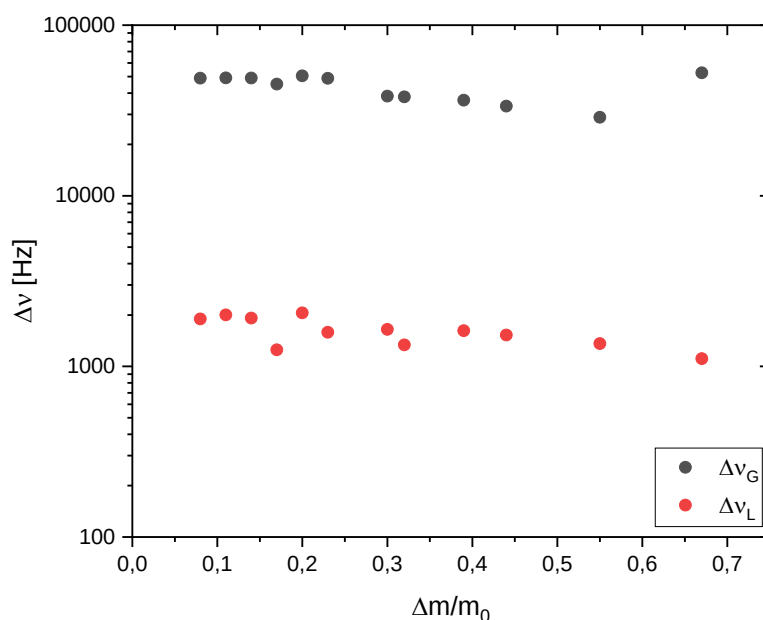
Rys. 16 Przykładowe widma ^1H -NMR zarejestrowane dla próbek uwodnionych do poziomu **a)** $\Delta m/m_0 = 11\%$ **b)** $\Delta m/m_0 = 39\%$ **c)** $\Delta m/m_0 = 67\%$ wraz z dopasowaną funkcją (72)

Szerokość połówkowa linii Gaussa spada od wartości $\Delta\nu_G = 48,882$ kHz do wartości $\Delta\nu_G = 28,861$ kHz wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki od 0,08 do 0,67 (Rys. 17). Czas relaksacji spinowo-spinowej składowej stałej policzono według wzoru:

(73)

$$T_{2S}^* = \frac{\sqrt{2}}{\pi\Delta\nu_G},$$

i uzyskano wartość uśrednioną równą $T_{2S}^* = (10.41 \pm 4.7)$ μ s. Wartość ta jest krótsza niż uzyskana w pomiarach relaksometrycznych NMR (patrz rozdz. 4.5) równa 23 μ s, co może być związane z efektami aparaturowymi.

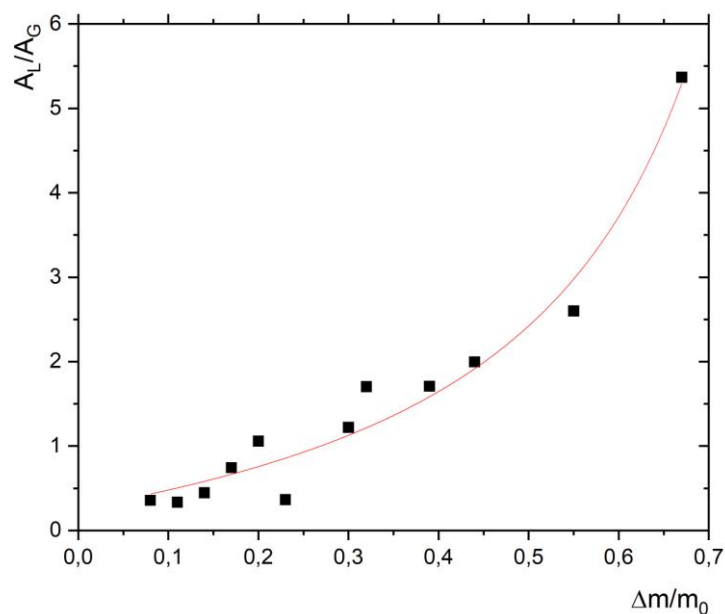


Rys. 17 Szerokości połówkowe dopasowanej linii Gaussa $\Delta\nu_G$ oraz linii Lorentza $\Delta\nu_L$ w funkcji wzrastającego poziomu uwodnienia w zakresie od $\Delta m/m_0 = 9\%$ do 67%

Dla całego badanego zakresu hydratacji, w odróżnieniu od wyników relaksometrycznych $^1\text{H-NMR}$ (patrz rozdz. 4.5), udało się wyodrębnić w widmie jedynie pojedynczą linię Lorentza L_L . Szerokość połówkowa linii maleje w przedziale od około $\Delta\nu_L \approx 2.00$ kHz do 1.11 kHz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki od 8% do 67% (Rys. 17).

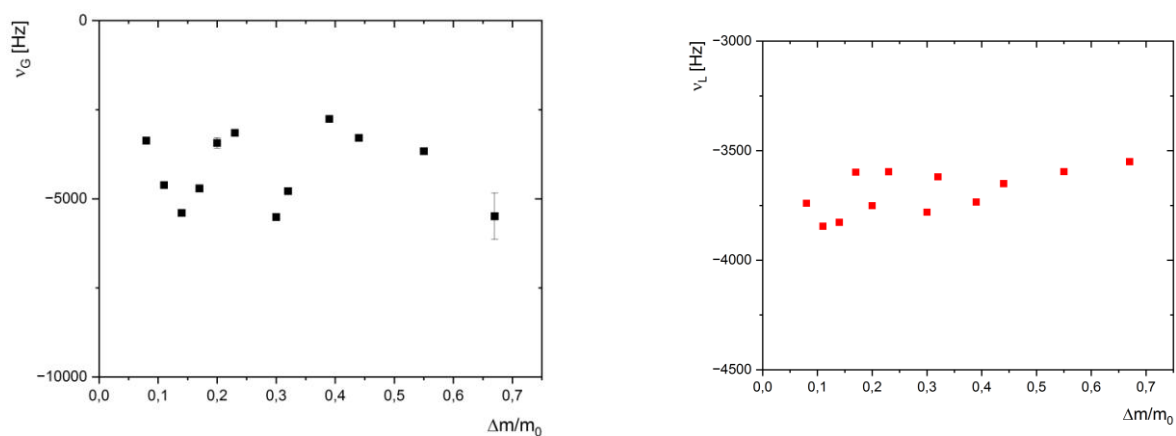
Zwężanie się linii w funkcji wzrastającego uwodnienia próbki sugeruje, że dopasowana linia Lorentza prawdopodobnie nie odzwierciedla pojedynczej frakcji wody, ale wydaje się uśredniać frakcje wody ściśle i luźno związanej znajdujące się w reżimie szybkiej wymiany. Rozkład widma na dwie składowe lorentzowskie nie był możliwy, co było związane z poszerzeniem linii rezonansowej L_2 przez niejednorodności pola magnetycznego B_0 w stopniu uniemożliwiającym jego odróżnienie od linii rezonansowej L_1 . Wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia widmo pozostaje superpozycją linii Gaussa i linii Lorentza, przy czym wzrasta udział frakcji wody luźno związanej w widmie.

W dalszej części analizy wykreślono pole powierzchni pod linią Lorentza A_L wyrażone w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa A_G w funkcji wzrastającego uwodnienia próbki. Rysunek 17 pokazuje wzrost udziału sygnału cieczowego w jednostkach sygnału ciała stałego wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. Zdecydowanie lepsze dopasowanie uzyskano dla modelu nieliniowego, co może sugerować obecność rozpuszczalnej w wodzie frakcji stałej plechy. Dopasowano funkcję wymierną wg modelu (58) i wyznaczono stężenie nasyceniowe rozpuszczalnej w wodzie frakcji stałej dla *U. aurantiaco atra* równe $c_s = 0.64(0.43)$ i zgodne w granicach niepewności pomiarowej z wynikiem uzyskanym w analizie pomiarów relaksometrii NMR. Podobne wartości stężenia nasyceniowego uzyskuje się dla ksylozy, galaktozy czy sacharozy [Rahway 2006].



Rys. 18 Zależność hydratacyjna pola powierzchni pod linią Lorentza wyrażonej w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa, linia ciągła to dopasowanie funkcji wymiernej (58).

Na Rys. 19 zestawiono położenia pików Gaussa ν_G oraz Lorentza ν_L w funkcji wzrastającego poziomu uwodnienia próbki. Wartość położenia pików Lorentza zmienia się nieznacznie i wynosi średnio około -3,7 kHz. W odróżnieniu od linii cieczowej, położenie środków pików Gaussa wykazuje duży rozrzut od poziomu uwodnienia.



Rys. 19 Położenie pików Gaussa, ν_G , oraz pików Lorentza, ν_L , w funkcji wzrastającego poziomu hydratacji $\Delta m/m_0$ dla plechy *U. aurantiaco-atra*.

4.4 Zależności temperaturowe widm ^1H -NMR

Zmierzono widma ^1H -NMR plech chłodząc próbkę w zakresie temperatur od 295 K do 215 K, dla dwóch różnych poziomów hydratacji: $\Delta m/m_0 = 67\%$ oraz 9% (próbka powietrznie sucha). W celu rejestracji całego sygnału, tzn. zarówno składowej pochodzącej od frakcji cieczowej, jak i sygnału od frakcji stałej próbki zastosowano impuls NMR o wysokiej mocy. Długość impulsu $\pi/2$ wynosiła $2.1 \mu\text{s}$. Zarejestrowano niehomogenne widma będące złożeniem sygnałów od różnych frakcji protonów różniących się otoczeniem oraz mobilnością (Rys. 19).

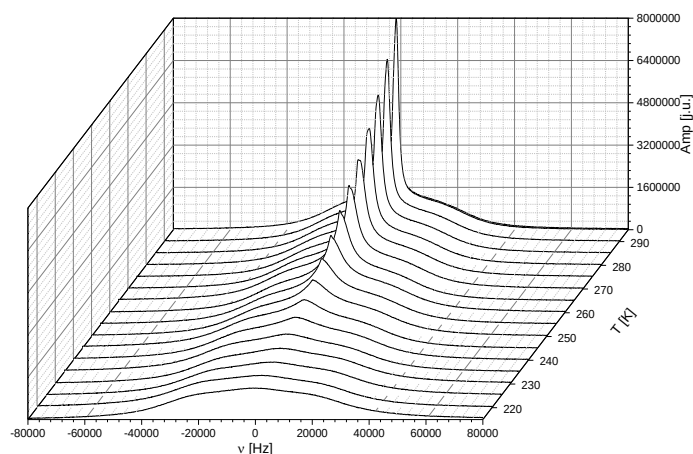
Widma opisano superpozycją funkcji Gaussa oraz funkcji Lorentza:

(74)

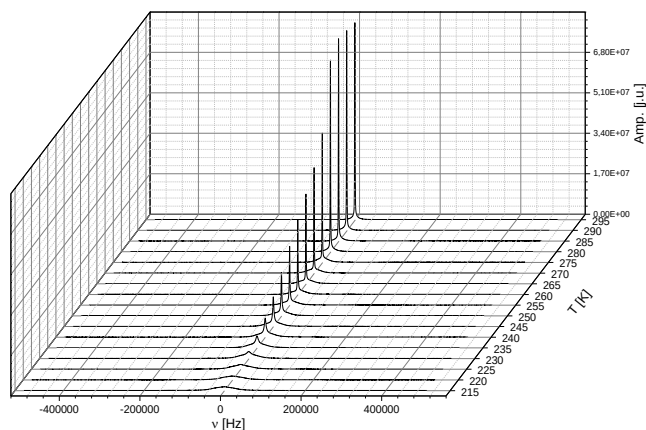
$$A(\nu) = y_0 + \frac{A_s}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_s} \exp \left[-2 \cdot \left(\frac{\nu - \nu_s}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_s} \right)^2 \right] + \frac{2A_L}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_L}{4(\nu - \nu_L)^2 + (\Delta \nu_L)^2} \right]$$

Gdzie: y_0 to składowa stała napięcia, $\Delta \nu_G$, $\Delta \nu_L$ – szerokości połówkowe linii Gaussa i linii Lorentza; ν_G , ν_L – położenia pików linii Gaussa i Lorentza; S_G , S_L – pole powierzchni pod linią Gaussa i Lorentza.

a)



b)

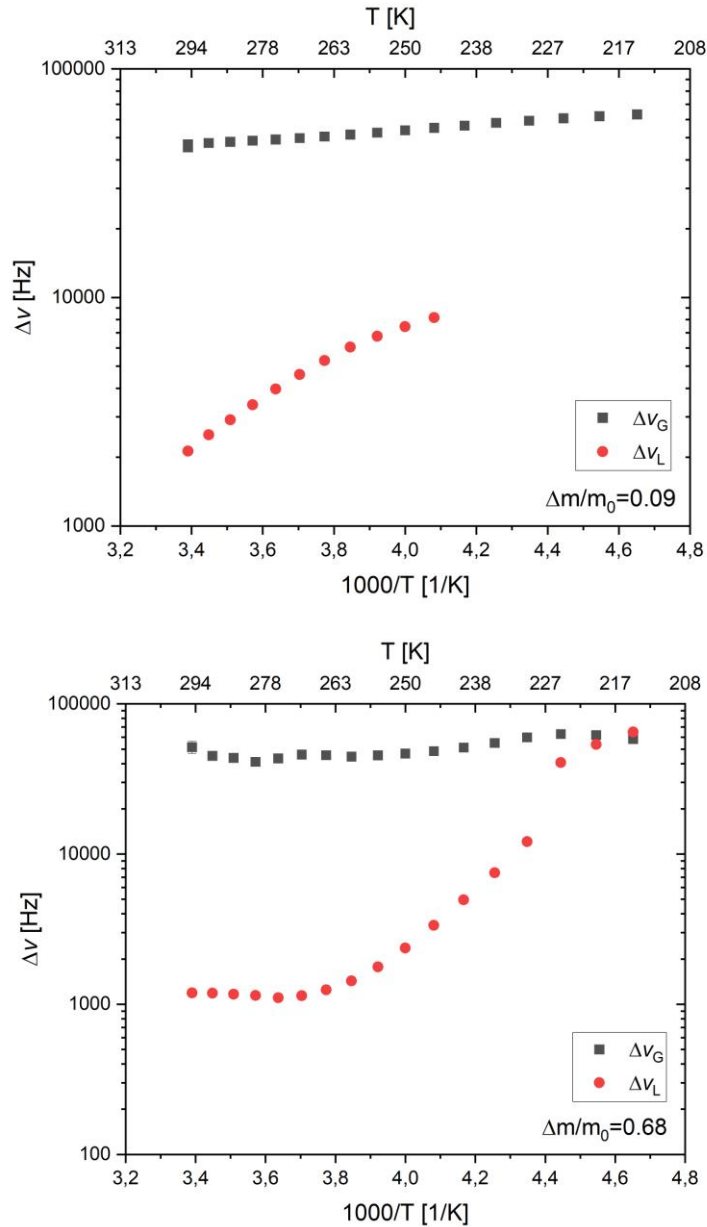


Rys. 20. Widma ^1H -NMR zarejestrowane dla próbek plechy *Usnea aurantiaco-atra* uwodnionej do poziomu **a)** $\Delta m/m_0 = 67\%$ oraz **b)** 9% ; zmierzone w zakresie temperatur 295 - 215 K.

We wszystkich zarejestrowanych widmach wyodrębniono dwie składowe sygnału: składową pochodzącą od protonów frakcji stałej opisywanej linią Gaussa (szerokość połówkowa około 50 kHz) oraz jedną, uśrednioną składową cieczową od wody związanej opisywaną linią Lorentza (szerokość połówkowa około 5 kHz).

Zaobserwowano wzrost szerokości połówkowej linii gaussowskiej w funkcji obniżanej temperatury. Dla próbki powietrznie suchej szerokość połówkowa linii Gaussa rośnie od wartości $\Delta\nu_G = (46.71 \pm 0.07)$ kHz w temperaturze 295 K to wartości $\Delta\nu_G = (63.19 \pm 0.07)$

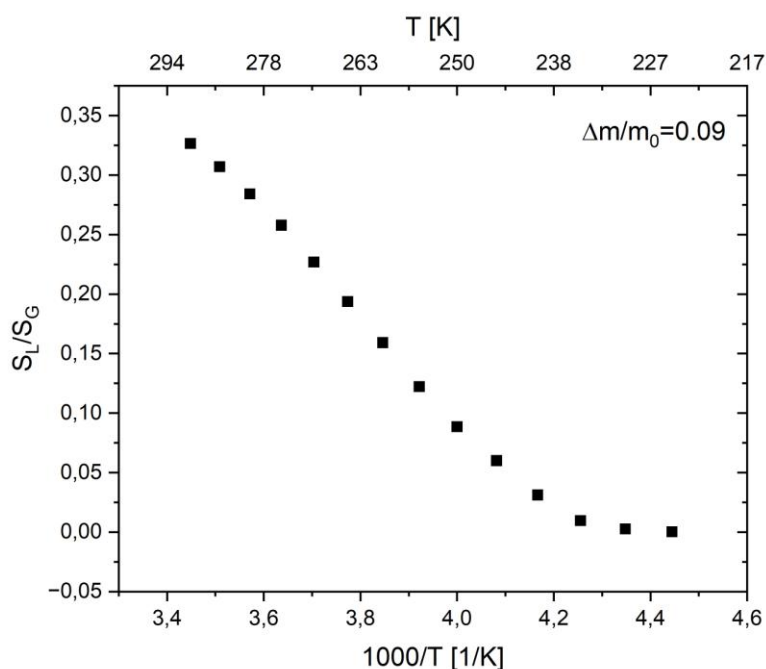
kHz w temperaturze 215 K. Dla próbki uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.68$ również zaobserwowano wzrost szerokości połówkowej linii Gaussa od wartości $\Delta v_G = (51.40 \pm 4.88)$ kHz w temperaturze 295 K do wartości $\Delta v_G = (58.31 \pm 0.12)$ kHz w temperaturze 215 K. Wzrost szerokości połówkowej linii Gaussa odzwierciedla stopniowe unieruchamianie frakcji stałej protonów budujących plechę postępujące wraz z ochładzaniem układu i co za tym idzie wzrost zakresu pól lokalnych.



Rys. 21 Szerokości połówkowe dopasowanej linii Gaussa Δv_G oraz Lorentza Δv_L w funkcji spadającej temperatury w zakresie 295 K – 215 K dla próbek uwodnionych do poziomu a) $\Delta m/m_0 = 0.09$ b) $\Delta m/m_0 = 0.68$

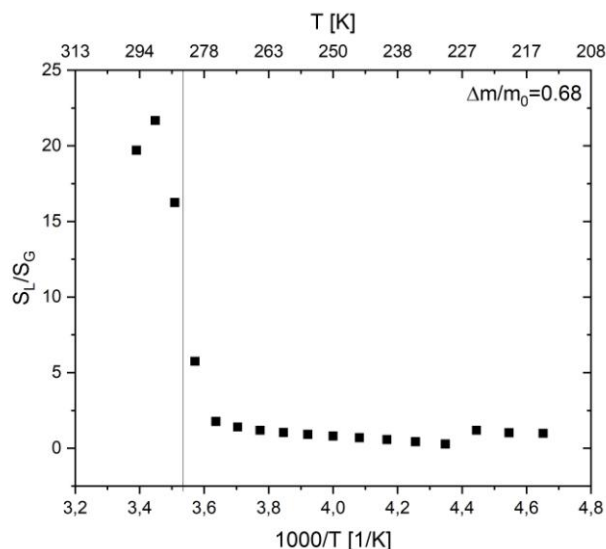
Analogenicznie zaobserwowano wzrost szerokości połówkowej linii Lorentza w obu badanych próbkach (powietrznie suchej oraz uwodnionej do poziomu 0.68) wraz ze spadkiem temperatury. Zjawisko jest związane z unieruchamianiem molekuł przechłodzonej wody związanej postępującym przy ochładzaniu. Dla próbki uwodnionej do 0.68 w najniższych temperaturach linia Lorentza osiąga właściwie szerokość połówkową linii Gaussa. Obserwujemy zamarzanie wody.

Pole powierzchni pod wykresem linii w widmie $^1\text{H-NMR}$ jest proporcjonalne do liczby protonów dających sygnał. W kolejnej części pracy wyznaczono stosunek pól powierzchni pod wyszczególnionymi liniami, będący miarą proporcji protonów w poszczególnych frakcjach wody związanej. Pole powierzchni pod linią Gaussa S_G przyjęto za jednostkę dla skalowania pola powierzchni pod linią lorentzowską S_L . Stosunek wykreślono w funkcji temperatury próbki. Jak można zauważyć na Rys. 22, dla niskiego poziomu uwodnienia ($\Delta m/m_0 = 0.09$) występuje ciągły, łagodny spadek stosunku sygnałów S_L/S_G przy ochładzaniu próbki, co może świadczyć o stopniowym, niekooperatywnym unieruchamianiu cząsteczek wody.



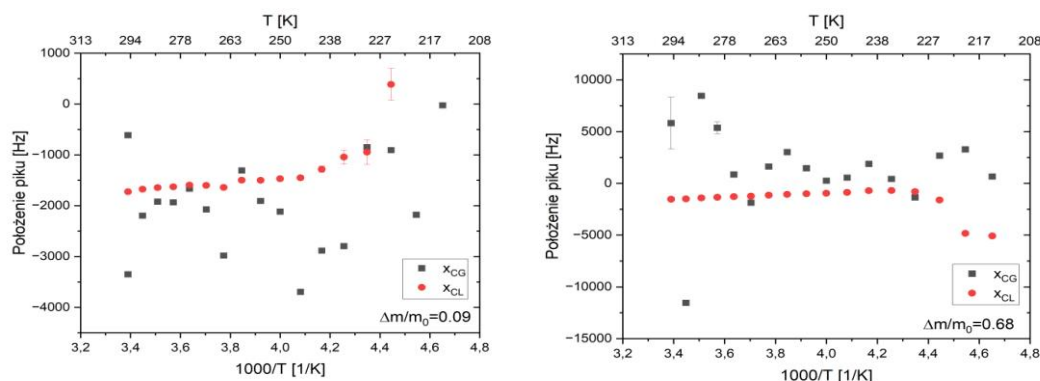
Rys. 22 Zależność temperaturowa pola powierzchni pod linią Lorentza wyrażonego w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa dla próbek uwodnionych do poziomu: $\Delta m/m_0 = 9\%$ i **b)** $\Delta m/m_0 = 67\%$.

Odmienny od powyższego, skokowy charakter spadku stosunku sygnałów S_L/S_G dla próbki o wyższym poziomie uwodnienia ($\Delta m/m_0 = 0.68$) odzwierciedla zjawisko przejścia fazowego. Obserwuje się kooperatywne unieruchamianie molekuł z utworzeniem kryształka lodu. Takie zachowanie może świadczyć o mniejszej efektywności mechanizmów broniących przed niszczącym tkanki zamarzaniem wody dla plech uwodnionych do wyższych poziomów.



Rys. 23 Zależność temperaturowa pola powierzchni pod linią Lorentza wyrażonego w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa dla próbek uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 68\%$.

Na Rys. 24 przedstawiono położenie centrów pików linii Gaussa i Lorentza w funkcji obniżanej temperatury. Położenia środków pików dla sygnału ciała stałego, charakteryzującego się o wiele większą szerokością połówkową w stosunku do pików Lorentza wykazywały dużą fluktuację.



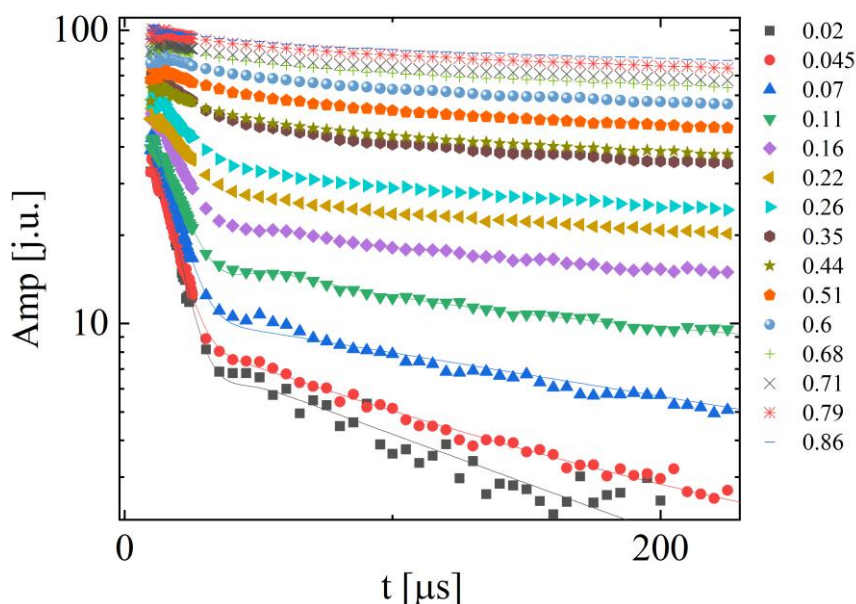
Rys. 24 Położenie środków linii Gaussa x_{CG} oraz Lorentza x_{CL} w funkcji obniżanej temperatury w zakresie 295 K – 215 K dla próbek uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 9\%$ (rys. lewy) oraz 68% (rys. prawy).

4.5 Wyniki relaksometrii ^1H -NMR

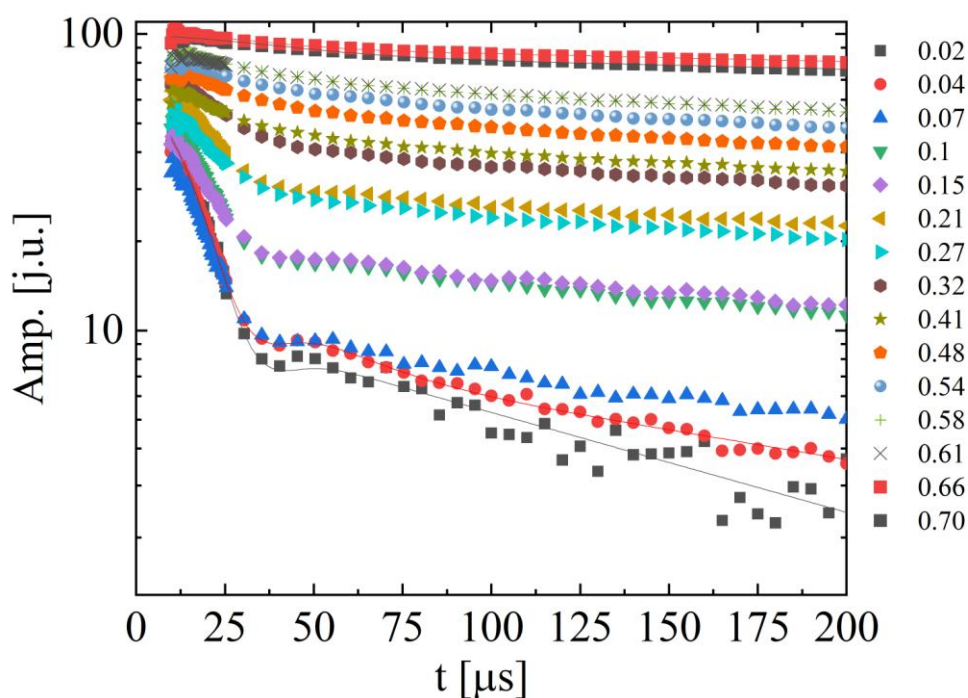
Zbadano wpływ wilgotności środowiska na plechę porostu *Usnea aurantiaco-atra*. Zarejestrowano na relaksometrze ^1H -NMR zaniki swobodnej precesji w funkcji hydratacji z fazy gazowej. W celu zbadania różnic w sposobie wiązania wody do plechy analizie poddano dwa rodzaje próbek: 1) zebrane w 2002 roku z siedliska Mount Wawel (próbka I) oraz 2) zebrane w 2009 na Penguin Island (próbka II). Próbki pochodziły z różnych siedlisk, różniły się także czasem przechowywania w zielniku w stanie anhydrobiozy.

Zanik swobodnej precesji jest superpozycją szybko zanikającej funkcji gaussowskiej, sygnału pochodzącego od matrycy stałej plechy porostu oraz zanikającego eksponencjalnie sygnału od mobilnych protonów wody związanej w plesze. W sygnale od protonów mobilnych można wyodrębnić jedną lub więcej składowych.

Do badań zależności hydratacyjnej, próbki plechy zostały uwodnione do różnych poziomów $\Delta m/m_0 = 0.02; 0.04; 0.07; 0.11; 0.15; 0.21; 0.27; 0.33; 0.41; 0.48; 0.54; 0.58; 0.61$, po czym badane metodą relaksometrii ^1H -NMR. W temperaturze pokojowej (około 22°C) zarejestrowano sygnały swobodnej precesji FID dla każdego poziomu uwodnienia.



Rys. 25 Sygnały zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla próbki I *U. aurantiaco-atra* zarejestrowane dla uwodnień z zakresu $\Delta m/m_0 = 0.02$ do 0.86 wraz z dopasowaniami.

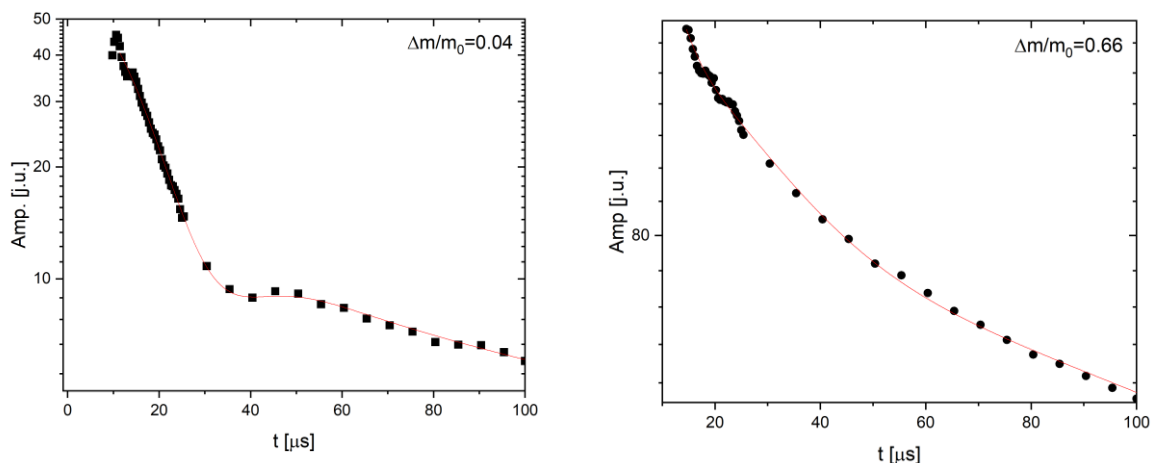


Rys. 26 Sygnały zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR dla próbki II *U. aurantiaco-atra* zarejestrowane dla uwodnień z zakresu $\Delta m/m_0 = 0.02$ do 0.70 wraz z dopasowaniami.

Składowa stała zarejestrowanego sygnału dla najniższych poziomów hydratacji ujawniła bardziej złożony charakter. W sygnale pojawiła się charakterystyczna „falka”, występująca w okolicy 40 μs , tzw. *beat pattern* (Rys. 27). W tym przypadku do sygnału stałego dopasowano funkcję Abragama, będącą iloczynem funkcji sinkusa i Gaussa [Derbyshire et al., 2004].

Charakterystyczny kształt *beat pattern* w sygnale może sugerować obecność fazy szklistej w badanych suchych próbkach, ale oznacza zanik pól lokalnych dla wartości mniejszych, niżby wynikało to z rozkładu gaussowskiego. Hipotetyczne utrzymanie stanu szklistego sacharozy i trehalozy zapewnia wysoką lepkość matrycy stałej, przez co może chronić przed niszczącymi procesami, takimi jak tworzenie krystalitów lodu. Fenomenologiczne równanie Gordona-Taylora [Gordon, Taylor, 1952] [Crowe, 2002] temperatura przejścia szklistego w układach woda – cukier spada radykalnie wraz z poziomem uwodnienia. Poziom uwodnienia dla którego z powodzeniem dopasowano funkcję

Abraham w zarejestrowanych widmach jest jednak za wysoki, by przejście szkliste wystąpiło w układzie w temperaturze pokojowej.



Rys. 27: Porównie sygnałów zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR-FID, zarejestrowanych dla tej samej próbki *Usnea aurantiaco-atra* uwodnionej do dwóch znacząco różnych poziomów uwodnienia **a)** $\Delta m/m_0 = 0.04$ wraz z dopasowaniem funkcji Abrahama oraz **b)** $\Delta m/m_0 = 0.66$ wraz z dopasowaniem funkcji Gaussa.

Uzyskano następujące wartości parametru a funkcji Abrahama:

- i) $a = (0.0984 \pm 0.0050) \mu\text{s}^{-1}$ dla próbki 1. uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.02$;
- ii) $a = (0.1092 \pm 0.0112) \mu\text{s}^{-1}$ dla próbki 1. uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.04$;
- iii) $a = (0.0922 \pm 0.0106) \mu\text{s}^{-1}$ dla próbki 2. uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.02$;
- iv) $a = (0.0740 \pm 0.0297) \mu\text{s}^{-1}$ dla próbki 2. uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.045$.

Dla pozostałych przypadków do zebranych danych pomiarowych dopasowano funkcję, będącą złożeniem funkcji Gaussa pochodzącej od protonów budujących stałą matrycę plechy (protony o ograniczonej mobilności) oraz sumy dwóch eksponent - wyodrębniono sygnał pochodzący zarówno od protonów mobilnych z warstwy ściśle, jak i luźno związanej.

Podsumowując w zależności od poziomu hydratacji próbek zarejestrowane sygnały dopasowano różnymi funkcjami:

- i) dla najniższych poziomów uwodnień (z zakresu $\Delta m/m_0 = 0.02 - 0.04$ dla próbki 1) oraz $\Delta m/m_0 = 0.02 - 0.045$ dla próbki 2)) składowa sygnału od protonów unieruchomionych została opisana funkcją Abragama, natomiast składowa cieczowa sygnału została opisana tylko jedną funkcją eksponencjalną:

$$FID(t) = y_0 + S \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2\right) \frac{\sin at}{at} + L_1 \exp\left(-\frac{t}{T_{2L1}^*}\right) \quad (75)$$

- ii) dla wyższych poziomów uwodnień (z zakresu $\Delta m/m_0 = 0.07 - 0.7$ dla próbki 1) oraz $\Delta m/m_0 = 0.02 - 0.04$ dla próbki 2)) składowa stała sygnału została opisana skutecznie funkcją Gaussa oraz składowa cieczowa sygnału została opisana za pomocą dwóch eksponent różniących się czasem relaksacji T_2^* :

(76)

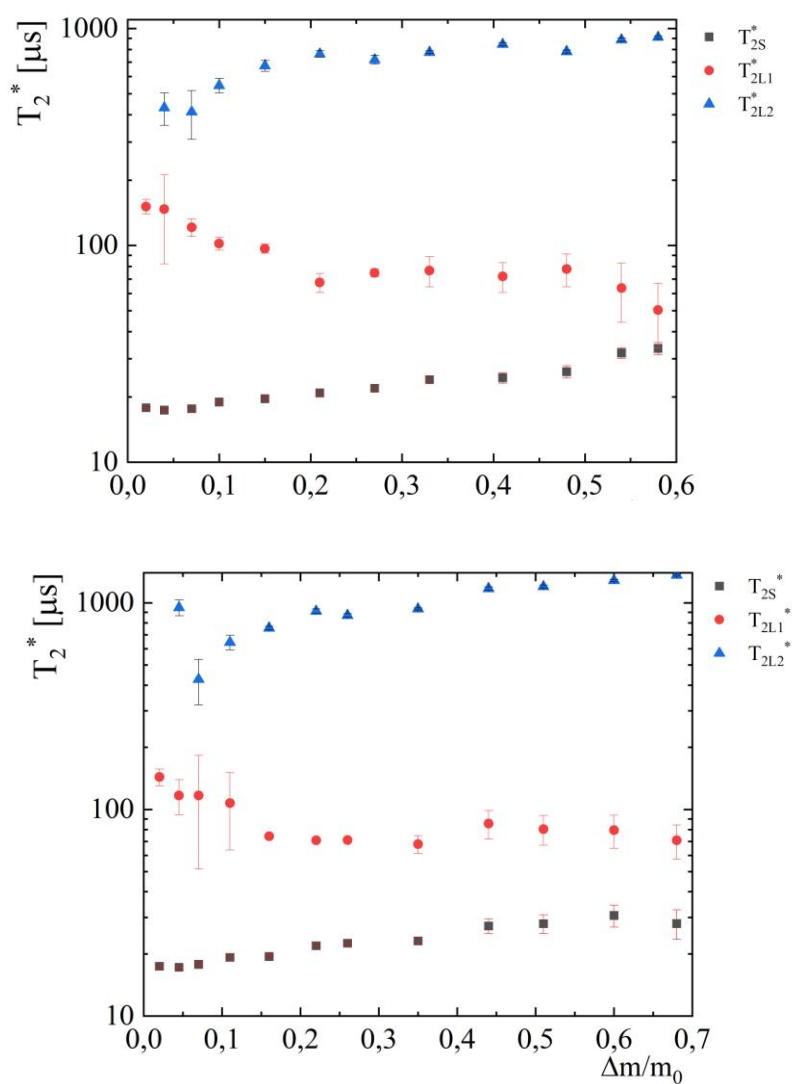
$$FID(t) = S \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2\right) + L_1 \exp\left(-\frac{t}{T_{2L1}^*}\right) + L_2 \exp\left(-\frac{t}{T_{2L2}^*}\right)$$

gdzie S to amplituda składowej stałej, L_1 , L_2 to amplitudy składowych cieczowych, T_{2G}^* to czas relaksacji stałej składowej, T_{2L1}^* , T_{2L2}^* to czasy relaksacji składowych cieczowych.

Czasy relaksacji wyodrębnionych składowych sygnału zaniku swobodnej precesji w funkcji rosnącego uwodnienia przedstawiono na Rys. 28. Można zauważyć, że wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbek sygnał pochodzący od unieruchomionych protonów frakcji stałej nie wykazuje znaczących zmian. Można na tej podstawie wysnuć wniosek, iż dynamika molekularna i struktura plechy nie zmienia się w badanym zakresie hydratacji z fazy gazowej.

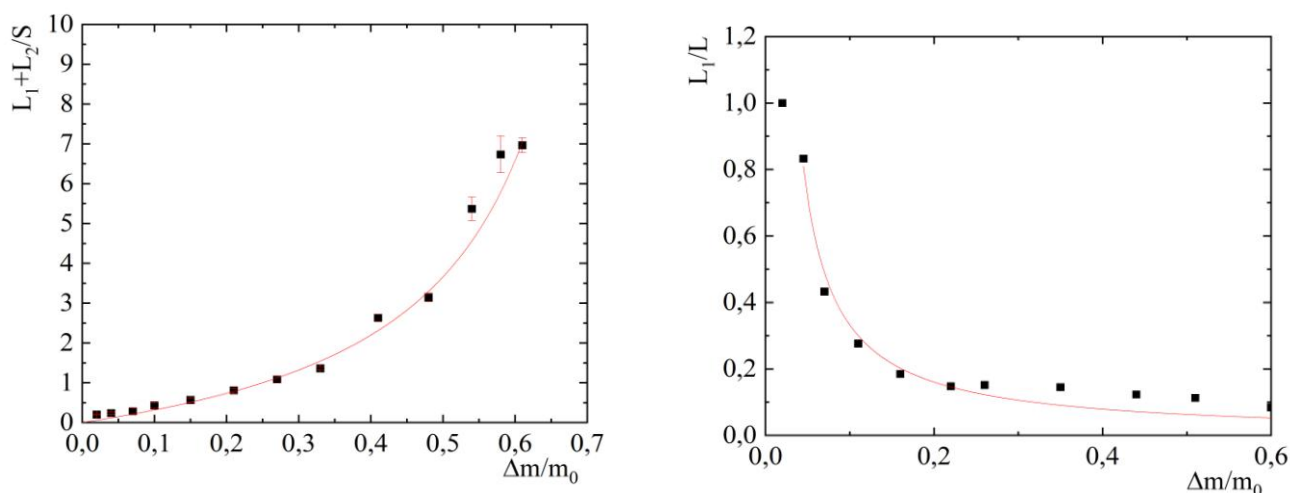
Do wolno zanikającego sygnału pochodzącego od protonów mobilnych dopasowano sumę dwóch funkcji eksponencjalnych, rozróżniając dwa podukłady spinowe w badanych

próbkach. Sygnał od mniej ruchliwej frakcji protonowej, L_1 , zanikający z czasem relaksacji T_{2L1} równym około 100 μs można powiązać częściowo z lipidami, a częściowo z pulą wody ściśle związanej do powierzchni (Harańczyk et al. 2015) i jest obserwowany dla wielu odwodnionych układów biologicznych (Harańczyk et al. 1999, 2008, 2009, 2012a, b, c). Sygnał L_2 , zanikający z czasem relaksacji T_{2L2} równym około 1000 μs pochodzi od frakcji wody luźno związanej.



Rys. 28 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji sygnału zaniku swobodnej precesji FID dla próbki *U. aurantiaco-atra*. Składowa Gaussowska T_{2G} – kolor niebieski, składowa od wody ściśle związanej T_{2L1} – kolor czerwony, składowa od wody luźno związanej T_{2L2} – kolor czarny.

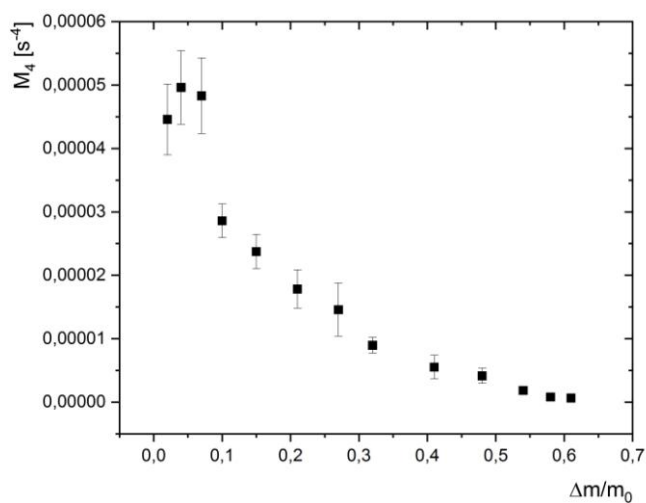
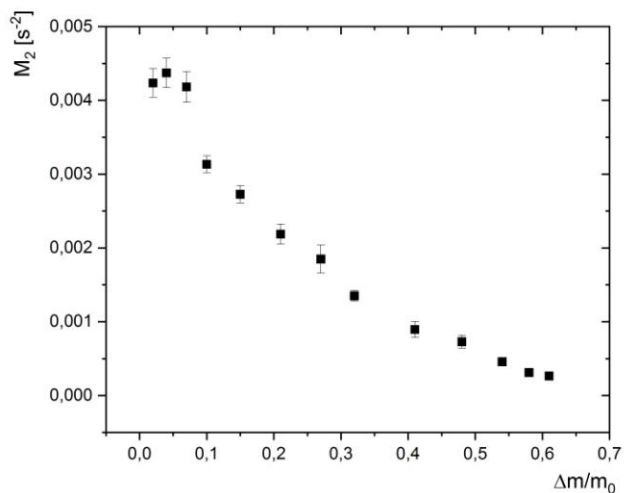
Zależności hydratacyjne amplitudy sygnału protonów mobilnych wyrażonej w jednostkach amplitudy sygnału stałego L/S przedstawiono na wykresie Rys. 28. Otrzymano nieliniowy spadek L/S dobrze dopasowany funkcją wymierną (Harańczyk et al. 2016, Baciorek et al. 2017). W oparciu o model funkcji wymiernej (68) i (69) wyznaczono parametry dla *U. aurantiaco atra*: stężenie nasyceniowe rozpuszczalnej frakcji stałej $c_s = 0.65(96)$,



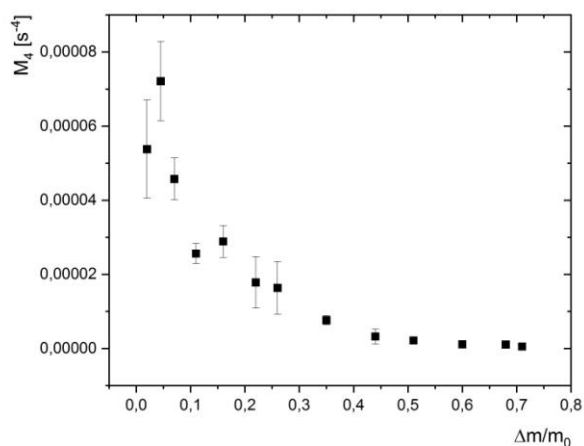
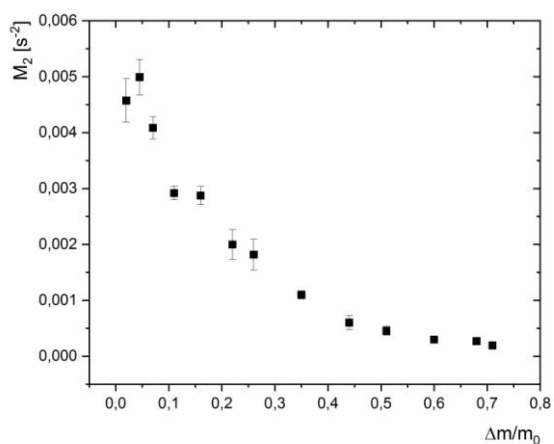
$$k = 1.22(56), \gamma = 0.65(01), \delta = 0.10(4.69).$$

Rys. 29 Zależność hydratacyjna stosunku sumy amplitud sygnałów L_1 i L_2 na jednostkę amplitudy sygnału S , oraz stosunku amplitudy składowej L_1 do sumy amplitud L_1 i L_2 wraz z dopasowaną funkcją wymierną wg modelu (68) (69).

W celu bardziej szczegółowej analizy rozwinęto składową stałą S sygnału w szereg momentów (jak opisano w rozdz. 2.1.5). Rysunki 29 i 30 pokazują hydratacyjną zależność momentów M oraz M_4 dla obu mierzonych próbek, odpowiednio starej i nowej. Analiza pokazała skokową zmianę wartości momentów składowej stałej dla uwodnienia około 0,1. Dla wyższych uwodnień wartości momentów M_2 i M_4 maleją w sposób ciągły wraz ze wzrastającym uwodnieniem, co można powiązać ze wzrostem mobilności protonów frakcji stałej. Takie zachowanie najprawdopodobniej odzwierciedla proces rozpuszczania frakcji stałej w próbce, co koresponduje z wynikami analizy stosunku sygnały L/S .



Rys. 30 Rozwinięcie w szereg składowej stałej sygnału FID dla nowej próbki *U. aurantiaco-atra* wykreślone w funkcji wzrastającego uwodnienia **a)** M_2 **b)** M_4



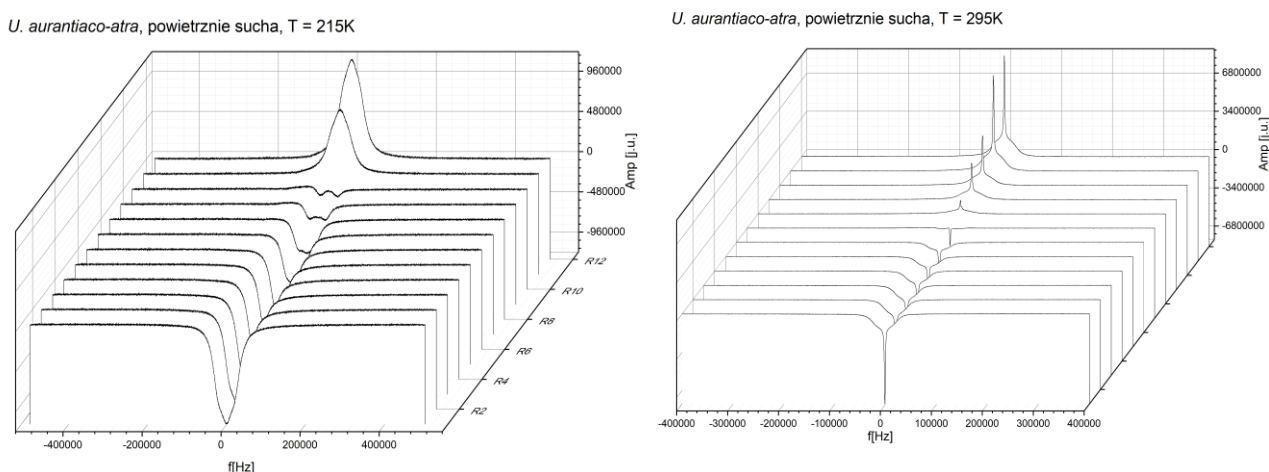
Rys. 31 Rozwinięcie w szereg składowej stałej sygnału FID dla nowej próbki *U. aurantiaco-atra* wykreślone w funkcji wzrastającego uwodnienia **a)** M_2 **b)** M_4

Celem przetestowania zasadności zastosowania modelu Gaussa do opisu składowej stałej sygnału zaniku swobodnej precesji policzono stosunki momentów M_4/M_2^2 . Wzięto pod uwagę tylko wyniki dla próbek uwodnionych do około 20%, przez wzgląd na opisany

powyżej proces rozpuszczania matrycy stałe porostu przy wyższych uwodnieniach. Uzyskano wyniki zbliżone do 3.0: $M_4/M_2^2 = 2.95 \pm 0.17$ dla próbki starej; $M_4/M_2^2 = 2.94 \pm 0.14$ dla próbki nowej. Jak widać uzyskany dla próbki sygnał jest w dobrym przybliżeniu gaussowski, co potwierdza zasadność stosowania tego modelu do opisu sygnału frakcji stałej w wynikach relaksometrii i spektroskopii ^1H -NMR.

4.6 Czas relaksacji spinowo-sieciowej T_1 w spektroskopii ^1H -NMR

Wykonano serię eksperymentów metodą spektroskopii relaksacyjnej ^1H -NMR z zastosowaniem sekwencji *Inversion Recovery* (IR) celem wyznaczenia czasów relaksacji spinowo - sieciowej T_1 . Na spektrometrze 300 MHz zarejestrowano rodzinę widm dla próbek *U. aurantiaco-atra* zdehydratowanych – tzw. powietrznie suchych (Rys. 32) Rejestracji dokonano w przedziale temperatur od 295 K do 215 K.



Rys. 32 Pomiar czasu relaksacji spinowo- sieciowej T_1 . Wybrane rodziny widm zarejestrowane dla próbki **a)** powietrznie suchej w temperaturze 215 K, **b)** powietrznie suchej w temperaturze 295 K, w funkcji odstępu τ między impulsami π oraz $\pi/2$.

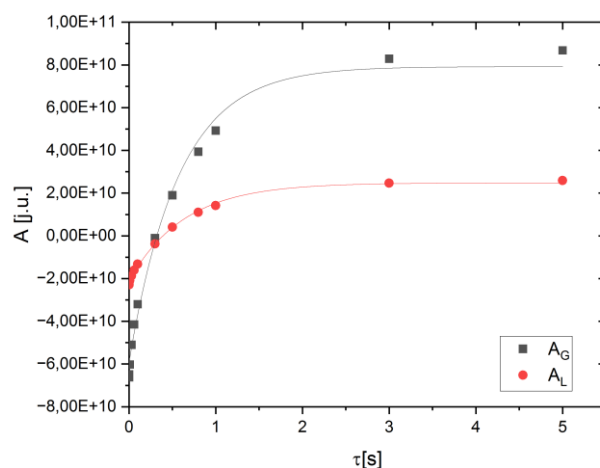
Wyodrębniono w widmach składową pochodzącą od protonów o ograniczonej mobilności opisywaną funkcją Gaussa o szerokości połówkowej około 46 kHz i jedną, uśrednioną składową cieczową opisywaną funkcją Lorentza o szerokości połówkowej około 2 kHz, przy czym poniżej temperatury 263 K nie udało się wyodrębnić linii lorentzowskiej od

śladowej wody w próbce. Analizowano odrost magnetyzacji każdej frakcji wykreślając zależność pola powierzchni pod linią w funkcji czasu τ (Rys 32). Dla każdej składowej niezależnie dopasowano eksponencjalną zależność opisującą relaksację spin-sieć:

(77)

$$A(\tau) = \frac{1}{A} \left(A_s \left[1 - 2 \exp \left(-\frac{\tau}{T_{1s}} \right) \right] + A_L \left[1 - 2 \exp \left(-\frac{\tau}{T_{1L}} \right) \right] \right)$$

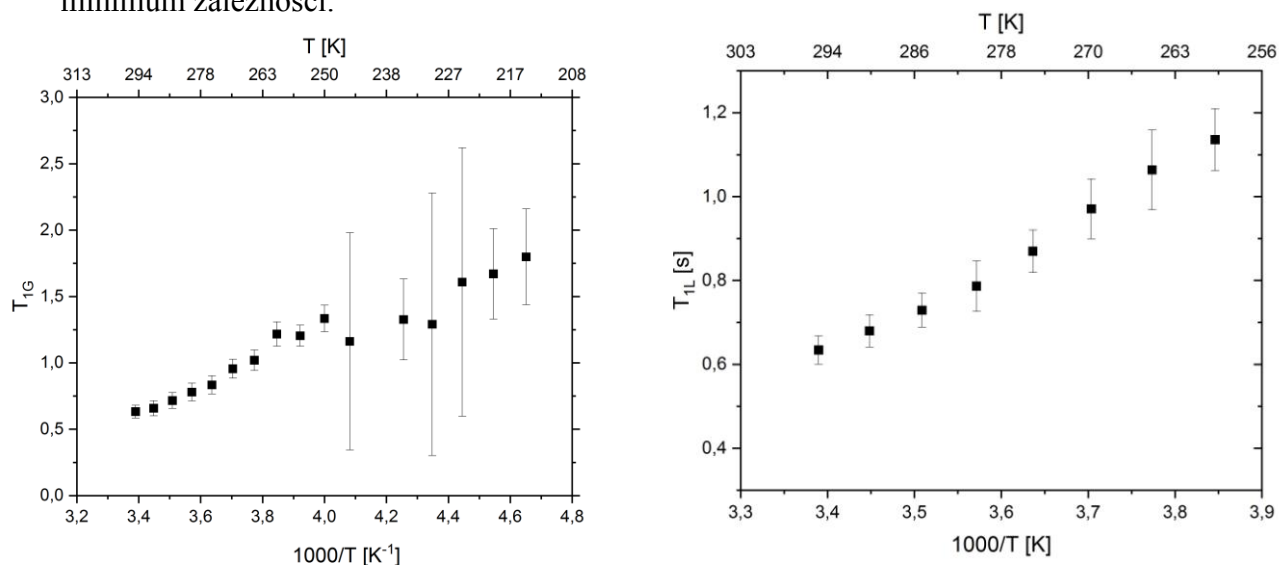
gdzie: T_{1s} i T_{1L} to odpowiednio czasy relaksacji spinowo-sieciowej dla składowej Gaussowskiej i dla składowej Lorentzowskiej, A_s i A_L jest polem pod składową gaussowską i składową lorentzowską w widmie, odpowiednio, natomiast A jest całkowitym polem pod widmem.



Rys. 33 Magnetyzacja spin-sieć dla składowych widm $^1\text{H-NMR}$: gaussowskiej i lorentzowskiej zarejestrowanych dla próbki powietrznie suchej w temp. pokojowej.

Dla próbki o poziomie hydratacji $\Delta m/m_0 = 0.09$ czas relaksacji spin-sieć T_1 w temperaturze 295 K wynosi 0,633(48) s dla ciała stałego oraz 0,634(34) s dla cieczy. Wraz ze spadkiem temperatury czasy te rosną do wartości 1,80(36) s w temperaturze 215 K dla ciała stałego oraz 1,136(74) s w temperaturze 260 K (dla niższych temperatur nie udało się wyodrębnić sygnału lorentzowskiego w widmie). Na Rysunku 33 przedstawiono czasy

relaksacji T_1 w funkcji $1000/T$. W badanych zakresie temperatur nie zaobserwowano minimum zależności.



Rys. 34 Zależności temperaturowe czasu relaksacji spin-sieć T_1 dla powietrznie suchej próbki *U. aurantiaco-atra*.

Do uzyskanych wartości dopasowano funkcję zakładającą arrheniusowską zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej od temperatury:

(78)

$$T_1 = T_0 \exp(-E_A/k_B T)$$

Po zlogarytmowaniu funkcja przyjmuje postać liniową:

(79)

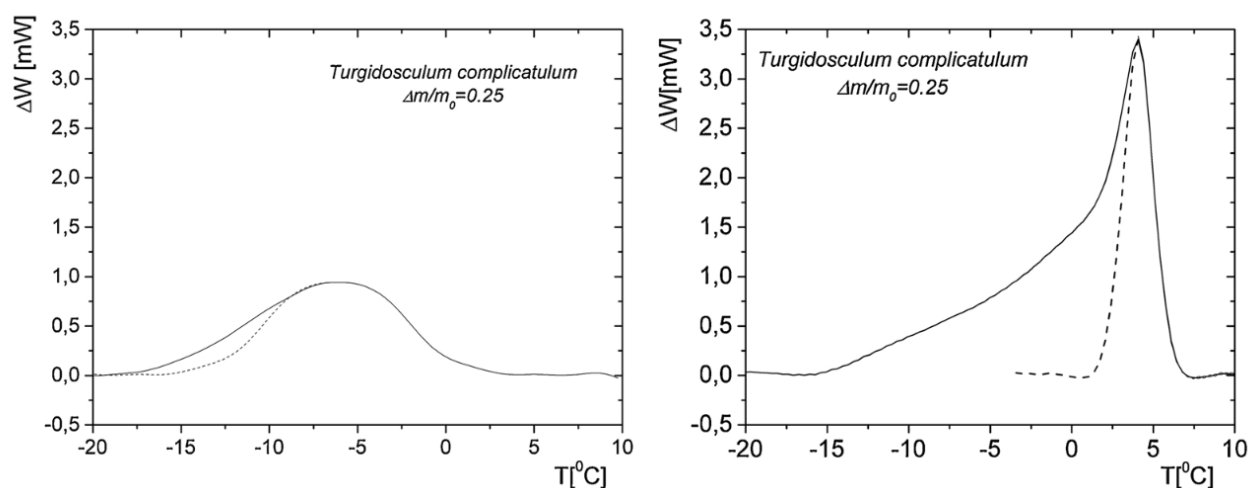
$$\ln T_1 = \ln T_0 + (-E_A/k_B) \cdot 1/T$$

z której otrzymujemy następujące wartości energii aktywacji: $E_A = 11,31(73)$ kJ/mol dla frakcji stałej oraz $E_A = 10,65(34)$ kJ/mol dla frakcji ciekowej. Nie udało się wyznaczyć średniej odległości między relaksującymi protonami z modelu BPP bez widocznego minimum zależności T_1 ($1000/T$).

4.7 Eksperymenty inkubacyjne DSC

Badaniu DSC poddano organizmy, które, podobnie jak *Usnea aurantiaco-atra*, zostały zebrane z siedliska na terenach Antarktyki Morskiej, Wyspy Króla Jerzego, mianowicie: grzyb zlichenizowany *Turgidosculum complicatulum* oraz będący jego fotobiontem glon *Prasiola crispa* a także grzyb zlichenizowany *Cetraria aculeata*.

Eksperyment inkubacyjny techniką DSC przeprowadzono dla plechy grzyba *T. complicatulum* uwodnionej z fazy gazowej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.25$ oraz $\Delta m/m_0 = 0.27$. Próbkę została schłodzona znacznie poniżej temperatury zamarzania, a mianowicie do -60°C , a następnie ogrzana do temperatury -20°C , przy której ruchy dyfuzyjne cząsteczek wody są znacznie szybsze. Próbkę inkubowano w tej temperaturze przez 120 minut. Stosunkowo długi czas inkubacji pozwolił molekułom wody na migrację i przyłączanie się do istniejących w próbce mikrokryształików lodu, pozostających początkowo poniżej zdolności rozdzielczej kalorymetru. Na rys. 35 przedstawiono zarejestrowane termogramy (ścieżka grzania) : 34. a) termogram ogrzewania bez inkubacji b) termogram ogrzewania po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze -20°C .



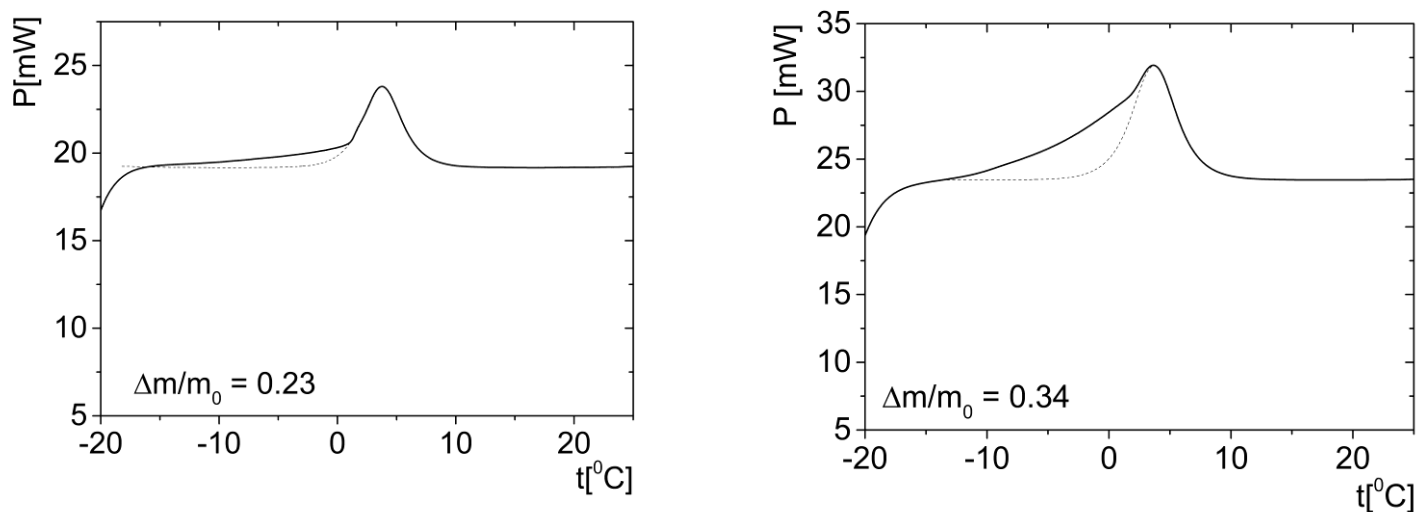
Rys. 35 a) Termogram DSC zarejestrowany przy tempie grzania $20^\circ\text{C}/\text{min}$ dla ogrzewania próbki plechy *T. complicatulum* uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,25$; **b)** termogram DSC zarejestrowany dla ogrzewania próbki plechy *T. complicatulum* uwodnionej do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,25$ po inkubacji w temperaturze -20°C przez 120 min [Bacior, 2019]

Zanotowano znaczny wzrost entalpii przejścia po inkubacji. Wartości entalpii przejścia określone bez inkubacji wynosiły: $\Delta H = 1,53 \text{ J/g}$, a $\Delta H = 2,59 \text{ J/g}$ odpowiednio dla próbek uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0,25$ i $\Delta m/m_0 = 0,27$, natomiast po eksperymencie inkubacyjnym wartości te osiągnęły: $\Delta H = 6,12 \text{ J/g}$ i $\Delta H = 11,43 \text{ J/g}$ dla mniejszego i dla wyższego poziomu uwodnienia próbki.

Zarejestrowane krzywe kalorymetryczne po inkubacji próbki charakteryzowały się wysoce niesymetrycznym kształtem, ujawniając obok piku głównego charakterystyczne niskotemperaturowe ramię (Rys 34.b)). Krzywe zostały numerycznie rozłożone na dwie składowe tj. symetryczną część główną i pik niskotemperaturowy. Zależności hydratacyjne obszaru pod głównym pikiem i pod pikiem niskotemperaturowym miały postać liniową.

Podobne wyniki uzyskano dla próbek krzaczkowatego grzyba zlichenizowanego *Cetraria aculeata*. Na rys. 36 przedstawiono zarejestrowane termogramy (ścieżka grzania) po 120-minutowej inkubacji w temperaturze -23°C dla próbek uwodnionych do poziomu: 35. a) $\Delta m/m_0 = 0,23$ b) $\Delta m/m_0 = 0,34$.

Występowanie ramienia niskotemperaturowego w krzywej DSC można powiązać najprawdopodobniej z cząsteczkami wody zgromadzonej w komórkach fotobionta.



Rys. 36 Termogramy DSC zarejestrowane po inkubacji w temperaturze -23°C przez 120 min dla ogrzewania próbki plechy *Cetraria aculeata* uwodnionej do poziomu **a)** $\Delta m/m_0 = 0,23$ **b)** $\Delta m/m_0 = 0,34$. Rejestracja przy tempie grzania 20°C/min [Nowak et al., 2019]

Istnienie niewielkich kompartmentów, w których temperatura topnienia wody jest znacznie bardziej obniżona w stosunku do pozostałej części plechy może być rodzajem przystosowania do zmieniających się i surowych warunków antarktycznych. Z drugiej strony można rozważyć również alternatywne wyjaśnienie asymetrii w pikie DSC dla niskich temperatur zakładające opóźnienie w procesie zamarzania i topnienia. Taki efekt mógłby być spowodowany działaniem białek z grupy AFP (ang. *antifreeze proteins*). Jednakowoż działanie AFP ujawnia się na bardzo wczesnych etapach tworzenia kryształków lodu, kiedy to wielkość jądra krystalizacji porównywalna jest z rozmiarami pojedynczej cząsteczki wody. Co więcej nie ma doniesień o występowaniu dostatecznych ilości AFP w plechach tych porostów. Wydaje się zatem, że niskotemperaturowe ramie pochodzi od wody zgromadzonej w komórkach fotobionta, które są oddzielone ścianami komórkowymi od wody zawartej między strzępkami mykobiontów. Efekt przypomina narastanie fazy w klasycznym układzie termodynamicznym, przy czym obserwowany jest w żywym układzie biologicznym [Nowak, 2018].

5. Dyskusja Wyników

W pracy doktorskiej poddano analizie wiązanie się molekuł wody do powierzchni plechy antarktycznego grzyba zlichenizowanego z gatunku *Usnea aurantiaco-atra* w procesie rehydratacji z fazy gazowej. Liczba frakcji wody związanej w plesze wraz z charakteryzującymi je parametrami: czasami hydratacji, masą wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące, a także czasami relaksacji $^1\text{H-NMR}$ dostarczają cennych informacji na temat gospodarki wodnej porostu. Zbadano także zachowanie się frakcji wody związanej do powierzchni podczas schładzania próbek *Usnea aurantiaco-atra*. Poddano analizie temperaturowe zależności sygnału $^1\text{H-NMR}$ w domenie czasu i częstości, które dostarczyły wiadomości na temat mobilności molekuł wody w plesze oraz obecności przejść fazowych.

Kinetyka hydratacji z fazy gazowej

Przeprowadzono badanie kinetyki hydratacji z fazy gazowej dla próbek *U. aurantiaco-atra* zawierających wyodrębnione fragmenty plechy: owocniki, „łodyżki” wreszcie kawałki plechy nie poddane fragmentaryzacji. Analiza wyników pozwoliła wyróżnić trzy frakcje wody związanej dla wszystkich trzech próbek, tj. i) frakcję wody bardzo ściśle związanej, usuwanej z próbki dopiero przy poddaniu jej długotrwałemu wygrzewaniu w temperaturze 70°C , ii) frakcję wody ściśle związanej, wysycającej pierwotne miejsca wiążące oraz iii) frakcję wody luźno związanej, przyrastającej proporcjonalnie wraz ze wzrostem względnej wilgotności otoczenia h . Dla wilgotności względnych do 76% kinetyka hydratacji wykazuje

przebieg jednoeksponeńcjalny. Dla najwyższych wilgotności względnych (od 88 % do 100 %) proces hydratacji jest dwueksponeńcjalny – obserwuje się proces wiązania wody luźno związanej. Podobny, dwueksponeńcjalny przebieg kinetyki hydratacji obserwowano dla innych porostów krzaczkowatych, na przykład dla gatunku *Ramalina terebrata* (Harańczyk et al. 2012b), dla *Leptogium puberulum* [Harańczyk et al. 2008], a także dla niektórych gatunków listkowatych, na przykład dla gatunku *Umbilicaria aprina*. Analiza parametrów kinetyki hydratacji ujawniła niewielkie różnice w sposobie rehydratacji z fazy gazowej dla poszczególnych fragmentów plechy. Dla owocników obserwowano mniejszy przyrost wody luźno związanej dla wysokich poziomów hydratacji, przy czym plecha nie poddana podziałowi uwadniała się w sposób podobny dla „gałązek”, co mogło być spowodowane niewielkim udziałem owocników w masie całej plechy. *Usnea auratiaco-atra* może tworzyć plechy znacząco zróżnicowane pod względem kształtu i budowy [Cao, 2012]. Wydaje się, że m.in. warunki wilgotności w otoczeniu mogą być czynnikiem warunkującym wygląd plechy.

Dla hydratacji w atmosferze względnej powyżej 88 proc. udział wiązanej wody znacząco rośnie do poziomu około 0.6 dla owocników czy 0.9 dla łodyżek. Może to oznaczać wznowienie procesów życiowych w organizmie, które dla *U. aurantiaco-atra* występuje przy uwodnieniu około 0.3. Porosty osiągają maksimum wydajności fotosyntetycznej zależnie od dyfuzji CO₂, która to z kolei zależy od stopnia uwodnienia. Dla *U. aurantiaco-atra* optimum procesu fotosyntezy przypada na $\Delta m/m_0 = 0.70$ [Kappen 1985].

Izoterma sorpcyjna

Dla wielu układów biologicznych izoterma sorpcyjna z powodzeniem opisywana jest modelem Denta (GAB) . Dla próbek *U. aurantiaco-atra* również skutecznie zastosowano model Denta do opisu izotermy sorpcyjnej. Masa wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące $\Delta M/m_0$ wyniosła i) $0,0616 \pm 0,0067$ dla łodyżek, ii) $0,0680 \pm 0,0021$ dla owocników oraz iii) $0,0440 \pm 0,0046$ dla plechy i można ją utożsamić jako frakcję wody wysycającą pierwotne miejsca wiążące w próbce. Otrzymane wyniki są podobne do tych uzyskiwanych dla innych gatunków grzybów zlichenizowanych: *Umbilicaria aprina* $\Delta M/m_0 = 0,054$, *Himantoria lugubris* $\Delta M/m_0 = 0,071$, *Cladonia mitis* $\Delta M/m_0 = 0,069$, *Ramalina terebrata* $\Delta M/m_0 = 0,046$ [Harańczyk et. al. 2008] [Harańczyk 2003].

Parametr $1/b_1$, będący miarą hydrofobowości powierzchni dla badanych próbek wyniósł: i) $0,0182 \pm 0,0631$ dla łodyżek, ii) $0,0479 \pm 0,0097$ dla owocników oraz iii) $0,0440 \pm 0,0046$ dla plechy. Mała hydrofilowość jest charakterystyczna dla gatunków krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych: parametr $1/b_1$ wynosi 1.11% dla gatunku *Himantoria lugubris*, 1.93% dla *Caloplaca regalis*, czy w końcu 2.59% dla *Usnea antarctica* [Harańczyk 2003].

Spektroskopia i relaksometria ^1H -NMR

Próbki *Usnea aurantiaco-atra* poddano badaniu ^1H -NMR w domenie czasu i częstości. Magnetyczny rezonans jądrowy to technika szeroko stosowana do badania procesów hydratacji i zamarzania w próbkach pochodzenia biologicznego (żywych organizmach, tkankach, nasionach). Eksperymenty NMR pozwalają rozróżnić frakcje protonowe w próbce ze względu na ich mobilność, podczas gdy metody kinetyki hydratacji i izotermy sorpcyjnej są czułe na frakcje wody różniące się stopniem związania do powierzchni (lub innych molekuł wody).

We wszystkich zarejestrowanych widmach wyodrębniono dwie składowe sygnały: składową pochodzącą od protonów frakcji stałej dobrze opisywanej linią Gaussa (szerokość połówkowa około 50 kHz) oraz jedną, uśrednioną składową cieczową od wody związanej opisywaną linią Lorentza (szerokość połówkowa około 5 kHz).

Analiza widm temperaturowych ^1H -NMR domenie częstości zmierzonych dla próbki *U. aurantiac-atra* powietrznie suchej, $\Delta m/m_0 = 0.09$ ujawniła poszerzanie się w sposób ciągły linii Lorentza wraz z obniżaniem temperatury próbek. Zaobserwowano przy tym ciągły spadek stosunku pola pod linią Lorentza do pola pod linią Gaussa. Na tej podstawie można wnioskować o obecności w układzie cieczy przechłodzonej. Zachodzą w układzie procesy niekooperatywnego unieruchamiania molekuł wody. Ponadto ciągły spadek sygnału od wody mobilnej świadczyć może o stopniowej migracji i przyłączaniu się molekuł do niewielkich, tworzących się w czasie trwania eksperymentu, krystalitów lodu.

Inny obraz uzyskano dla najwyższego z badanych poziomów hydratacji, tj. uwodnionej do poziomu 0.68. W tym przypadku obserwowano skokowy spadek pola pod

linią Lorentza wyrażonego w jednostkach pola pod linią Gaussa dla bardzo wąskiego przedziału temperatur. Zaobserwowano zajście przejścia fazowego – nukleacji kryształu lodu.

Jako że wyodrębniono w widmach jedynie uśrednioną linię od frakcji cieczowej, nie udało się stwierdzić wzrostu udziału puli wody ściśle związanej, kosztem wody luźno związanej wraz z obniżaniem temperatury. Mechanizm przemiany frakcji wody luźno związanej i zamarzającej we frakcję wody ściśle związaną i niezamarzającą był obserwowany u innych przedstawicieli arktycznych grzybów zlichenizowanych, przykładowo z gatunków: *Cladonia mitis*, *Umbilicaria aprina* [Harańczyk i in., 2012], *Cetraria aculeata* [Nowak, 2013]. Proces taki wiąże się z wydzielaniem przez grzyb substancji żelowych, powiększających liczbę pierwotnych miejsc wiążących przy powierzchni [Harańczyk, 2003]. Unieruchomione w żelu molekuly wody zachowują się jak woda związana do powierzchni plechy i nie ulegają zamarzaniu. Okazuje się, że opisany mechanizm nie jest regułą i może zależeć specyficznie od fizjologii gatunku. Brak omawianego mechanizmu stwierdzono dla próbek porostowych *T. complicatulum*. [Bacior 2016] [Bacior 2018].

Badania relaksometryczne ^1H -NMR pozwoliły wyróżnić dla niższych uwodnień i wyższych temperatur trzy frakcje protonów zawartych w próbce: protony ciała stałego, zawarte w strukturze plechy oraz dwie frakcje protonowe wody związanej przez plechę, różniące się znacząco czasami relaksacji T_2^* : wodę ściśle związaną i wodę luźno związaną. Uzyskano nieliniową postać stosunku sygnału frakcji cieczowej do sygnału frakcji stałej w funkcji wzrastającego uwodnienia. Taka postać jest charakterystyczna dla obecności rozpuszczalnej w wodzie frakcji stałej. Proces wzmaga się wraz z przyrastającą ilością związanej wody. Opisany mechanizm potwierdza również analiza wartości momentów M_2 oraz M_4 sygnału stałego FID. Wartości spadają w sposób ciągły wraz ze wzrastającym uwodnieniem, odzwierciedlając zmiany w mobilności protonów. Zaobserwowano jeden skokowy spadek wartości momentów linii dla uwodnienia przekraczającego około 0.1. Może to oznaczać uruchomienie nowego rodzaju ruchu w lipidach błon *U. aurantiaco-atra*. Podobne zjawisko obserwowano w błonach fotosyntetycznych pszenicy [Harańczyk et al., 2015], a także dla innego antarktycznego porostu *Cetraria aculeata* [Harańczyk et al., 2015]. Obliczone stężenie nasyceniowe frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie przy zastosowaniu funkcji wymiernej wyniosło $c_s = 0.65(09)$. Podobne wartości uzyskuje się dla niektórych cukrów (np. sacharozy, galaktozy czy ksylozy). Porównanie wyników relaksometrii dla

zrehydratowanych próbek zebranych w 2002 oraz 2009 roku nie pokazały różnic we właściwościach plechy z zależności od czasu przechowywania w zielniku w stanie życia utajonego.

Na podstawie przeprowadzonych badań można postulować istnienie mechanizmu broniącego przed zamarzaniem grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra*. Wykazano, że nukleacja krystalitów lodu nie występuje dla niższych poziomów uwodnienia. Pojawienie się niszczących tkanki krystalitów lodu zaobserwowano dopiero przy wyższych uwodnieniach próbek. Wydaje się zatem, że obrona przed przemarzaniem jest ściśle związana z gospodarką wodną badanych organizmów.

6. WNIOSKI

- 1.) Kinetyka rehydratacji z fazy gazowej próbek grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra* przyjmuje przebieg eksponencjalny, często występujący dla układów biologicznych. Wyróżniono trzy frakcje wody związanej w próbkach: wodę najściślej związaną, związaną ściśle oraz związaną luźno. Stwierdzono mniejsze tempo przyrostu masy wody związanej do powierzchni owocników niż do powierzchni łądyżek.
- 2.) Izotermę sorpcyjną badanego układu z powodzeniem opisano modelem sorpcji wielowarstwowej Denta (Guggenheim-Anderson-de Boer). Nie stwierdzono znaczących różnic w hydrofobowości poszczególnych fragmentów plechy *U. aurantiaco-atra*, tj. "łądyżek" i owocników.
- 3.) W widmach ^1H -NMR udało się rozróżnić frakcje protonowe różniące się mobilnością. Zarejestrowane widma były superpozycją funkcji Gaussa o szerokości połówkowej około 50 kHz pochodzącej od matrycy stałej plechy oraz funkcji Lorentza o szerokości połówkowej około 5 kHz pochodzącej od uśrednionej frakcji cieczy związanej w próbce.
- 4.) W badaniach relaksometrycznych ^1H -NMR udało się rozróżnić dwie frakcje wody związanej w całym zakresie badanych hydratacji, różniące się czasem relaksacji T_2^* , tj. wodę ściśle związaną i wodę luźno związaną.
- 5.) Stosunek sygnału ^1H -NMR od frakcji cieczerwowej wyrażony w jednostkach sygnału frakcji stałej wykreślony w zależności od wzrastającego uwodnienia opisywany był funkcją wymierną. Nadwyżkowy wzrost sygnału od protonów mobilnych prawdopodobnie wywołany był obecnością frakcji rozpuszczalnej matrycy stałej porostu. Porównano próbki zebrane w 2002 oraz 2009 roku. Różnica w czasie przechowywania w zielniku w stanie anhydrobiozy nie wpłynęła znacząco na właściwości plechy. Uzyskano wartość stężenia nasyceniowego frakcji stałej na poziomie około $c_s = 0.65$, zbliżoną do tych rejestrowanych dla niektórych cukrów.

- 6.) Analiza widm ^1H -NMR zarejestrowanych dla szerokiego przedziału temperatur (w zakresie 297-210K) pokazała dwa odmienne procesy immobilizacji wody związanej: kooperatywne zamarzanie z wytworzeniem krystalitu lodu dla próbki o wysokim poziomie uwodnienia (0.68) oraz niekooperatywne, ciągle unieruchamianie molekuł dla próbki mocno wysuszonej (0.09)
- 7.) W eksperymentach kalorymetrycznych DSC z inkubacją próbki w niskich temperaturach prowadzonych dla podobnych gatunków antarktycznych grzybów zlichenizowanych zaobserwowano proces dyfuzji cząsteczek wody przechłodzonej oraz zjawisko narastania fazy stałej, co znacząco obniżało próg pojawienia się kooperatywnego zamarzania.

LITERATURA

- [1] Abragam A., *The principles of nuclear magnetism*, Oxford Clarendon Press, (1961)
- [2] M. Baciór, H. Harańczyk, P. Nowak, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Olech, „Low-temperature investigation of residual water bound in free-living Antarctic *Prasiola crispa*, *Antarctic Science* **34**: 389-400 (2022)
- [3] M. Baciór, H. Harańczyk, P. Nowak, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Olech „Low-temperature immobilization of water in Antarctic *Turgidosculum complicatulum* and in *Prasiola crispa*: part I: *Turgidosculum complicatulum*”, *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces* **173**: 869-875, (2019)
- [4] Brunauer S., Emmett P.H., Teller E., Adsorption of Gases in Multimolecular Layers *Journal of American Chemistry Society*, **60**, 309, (1938)
- [5] Bystrek J., *Podstawy lichenologii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Skłodowskiej-Curie, Lublin 1997
- [6] Chary K.V.R., Govil G., *NMR in Biological Systems. From molecules to humans*, Springer 2008
- [7] de la Torre R., Sancho L.G., Horneck G., de los Rios A., Wierzchos J., Olsson-Francis K., Cockell C.S., Rettberg P., Berger T., de Verra J.P.P., Ott S., Frias J.M., Gonzalez-Melendi P., Lucas M.M., Reina M., Pintado A., Demets R., Survival of lichens and bacteria expose to outer space conditions – Results of Lithopanspermia experiments, *Icarus*, **208**, 75-748, (2010)

- [8] de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S., 2003. The potential of lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space – I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int. J. Astrobiol.* **1**, 285–293 (2003)
- [9] de Vera, J.-P., Rettberg, P., Ott, S., Life at the limits: Capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 457–468. (2008)
- [10] de Vera J.-P., Lichens as survivors in space and on Mars, *Fungal Ecology*, **5**, 472-479, (2012)
- [11] Dent R.W., A multilayer theory for gas sorption. Part I: Sorption of a single gas, *Textile Research Journal*, **47**, 145-152, (1977)
- [12] Fajardo-Cavazos P., Schuerger A., Nicholson W. Testing interplanetary transfer of bacteria between Earth and Mars as a result of natural impact phenomena and human spaceflight activities. *Acta Astronautica*. **60**. 534-540 (2007)
- [13] Gaff D.F., Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. *Oecologia (Berl.)*, **31**, 95-109, (1977)
- [14] Grimm M., Grube M., Schiefelbein U. Zuhlke D., Bernhardt J., Riedel K., The Lichens' Microbiota, Still a Mystery?. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 95-109, (2021)
- [15] Haken H., Wolf H.C., *Atomy i kwanty. Wprowadzenie do współczesnej spektroskopii atomowej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997
- [16] Harańczyk H., Gałdziński S., Olech M, Initial stages of lichen hydration observed by proton magnetic relaxation, *New Phytologist*, **138**, 191-202, (1998)
- [17] Harańczyk H., Gałdziński S., Olech M., Low temperature effect on the thallus of *Cladonia mitis* as observed by proton spin-lattice relaxation, *Molecular Physics Reports*, **29**, 15-18, (2000)
- [18] Harańczyk H., Grandjean J., Olech M., Low temperature effect in D₂O-hydrated antarctic lichen *Himantormia lugubris* as observed by ¹H NMR, *Molecular Physics Reports*, **33**, 220-224, (2001)

- [19] Harańczyk H., *On Water in Extremely Dry Biological Systems*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003
- [20] Harańczyk H., Grandjean J., Olech M., Freezing of water bound in lichen thallus as observed by ^1H -NMR.I. Freezing of loosely bound water in *Cladonia mitis* at different hydration levels, *Coloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **28**, 239-249, (2003)
- [21] Harańczyk H., Nowak P., Baciór M., Lisowska M., Marzec M., Florek M., Olech M.A., Bound water freezing in *Umbilicaria aprina* from Schirmacher Oasis, *Antarctic Science*, **24**, 342-352, (2012)
- [22] Hausser K.H., Kalbitzer H.R., *NMR w biologii i medycynie*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 1993
- [23] Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., Pegler D. N., *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed.*, Oxon (UK): CAB International, 1995
- [24] Hennel J.W., *Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1996
- [25] Hennel J.W., Klinowski J., *Podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2000
- [26] Kohlmeyer J., Hawksworth D.L., Volkmann-Kohlmeyer B., Observations on two maritime „borderline” Lichenes: *Mastodia tessellata* and *Collemopsidium pelvetiae*, *Mycological Progress*, **3**, 51-56, 2004
- [27] Kieft T.L., Ice nucleation Activity in Lichens, *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1679-1981, 1988
- [28] Kieft T.L., Ahmadjian V., Biological ice nucleation activity in lichen mycobionts and photobionts, *Lichenologist*, **21**, 355-362, (1989)
- [29] Kieft T.L., Ruscetti T., Characterization of Biological Ice Nuclei from a Lichen, *Journal of Bacteriology*, **172**, 3519-3523, 1990

- [30] Kohler P., Olech M., Polish botanical and mycological studiem of the Antarctic terrestrial and fresk water ecosystems In 1977-2009: An overview, *Polish Polar Research*, **2**, 157-174, (2011)
- [31] Lange O.L., Der CO₂-Gaswechsel von Flechten bei tiefen Temperaturen, *Planta*, **64**, 1-19, (1965)
- [32] Lange O.L., CO₂-Gaswechsel der Flechte *Cladonia alcicornis* nach langfistigem Aufenthalt bei tiefen Temperaturen, *Flora*, **156**, 500-502, (1966)
- [33] Langumir, I. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *Journal of American Chemical Society*, **40**, 1361-1403, (1918)
- [34] Larson D.W., Patterns of Lichen photosynthesis and respiration following roloned frozen storage, *Canadian Journal of Botany*, **56**, 2119-2123, (1978)
- [35] Li Y., Kromer B., Schukraft G., Bubenzer O., Huang MR., Wang ZM., Bian LG., Li CS. (2014) Growth rate of *Usnea aurantiaco-atra* (Jacq.) Bory on Fildes Peninsula, Antarctica and its climatic background, *PLoS One*, 9 (6), 2014
- [36] Nowak P., *Badanie molekularnych mechanizmów odporności na wysuszenie i zamarzanie u krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych*, Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 2013
- [37] P. Nowak, H. Harańczyk, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Lisowska, E. Baran, M. A. Olech "Bound water behaviour in *Cetraria aculeata* thalli during freezing", *Polar Biology* **41**: 865-876 (2018)
- [38] Olech M., *Lichens of King George Island, Antarctica*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2004
- [39] Parasyri A., Papazi A., Stamatis N., Zerveas S., Avramidou E. V., Doulis A. G., Pirintsos S., Kotzabasis K., Lichen as Micro-Ecostystem: Extremophilic Behavior with Astrobiotechnological Applications, *SymbiosisAstrobiology*, **18 (12)**, 1528-1542

- [40] Paracer S., Ahmadjian, *Symbiosis: an introduction to biological associations*, Oxford University Press, New York 2000
- [41] Pichler G., Muggia L., Carniel F. C., Gruba M., Kranner I., How to build a lichen: from metabolite release to symbiotic interplay, *New Phytologist*, **238**, 1362-1378, (2023)
- [42] Perez-Ortega S., de Los Rios A., Crespo A., Sancho L.G., Symbiotic life style and phylogenetic relationships of the bionts of *Mastodia tessellata* (Ascomycota, *Incerate sedis*), *Americal Journal of Botany*, **97**, 7338-752, (2010)
- [43] Rahway NJ, The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological, *Merck*, New York, (2006)
- [44] Rakusa-Suszczewski S., *Zatoka admiralicji Ekosystem strefy przybrzeżnej morskiej Antarktyki*, Oficyna Wydawnicza Instytutu Ekologii PAN, Dziekanów Leśny 1992
- [45] Sancho L. G., de la Torre R., Pintado A., Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology, *Fungal Biology Reviews*, **22**, 103-109, (2008)
- [46] Sanders W.B., Lichens: The Interface between Mycology and Plant Morphology, *BioScience*, **51**, 12, (2001)
- [47] Sarbak Z., *Adsorpcja i adsorbenty. Teoria i zastosowanie*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2000
- [48] Schroeter B., Scheidegger C., Water relations in Lichenes AT subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide Exchange in lichen *Umbilicaria aprina* from Continental Antarctica, *New Phytologist*, **131**, 273-285, (1995)
- [49] Tehler A., Wedin M., Systematics of lichenized fungi [W:] *Lichen Biology*. Second Edition. Nash III T. H. (red.). Cambridge University Press, New York, 336–352, (2008)

- [50] 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)
- [51] Wróbel S., Marzec M, *Różnicowa kalorymetria skaningowa*, w: *Komplementarne metody badan przemian fazowych*, pod red. Mikuli E., Migdał-Mikuli A., Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2006
- [52] Yoshimura I., Kurokawa T., Yamamoto Y., Kinoshita Y., Development of lichen thalli in vitro, *The Bryologist*, **96**, 412-421, (1993)

Spis ilustracji

Rys. 2 Schematyczny przekrój przez strukturę plechy grzyba zlichenizowanego z gatunku <i>Lobaria pulmonaria</i> . [Grimm et al., 2021, zmienione].....	16
Rys. 2 Przykłady występowania plechy listkowatej a) <i>Hypogymnia physodes</i> porastającej korę drzewa b) <i>Xantoria parentia</i> porastającej blok wapienny [fot. Autorki].....	17
Rys. 3 Wyspa Króla Jerzego w Szetlandach Południowych, miejsce zebrania próbek <i>Usnea aurantiaco-atra</i>	23
Rys. 4 Wysuszone plecha <i>Usnea aurantiaco-atra</i> przechowywana w zielniku, fot. Autorki.....	25
Rys. 5 Kwantowanie przestrzenne momentu magnetycznego w polu magnetycznym $\mathbf{B}_0$; rozszczepienie poziomów energetycznych w efekcie Zeemana dla jąder o spinie 1/2	30
Rys. 6 Czasy relaksacji podłużnej i poprzecznej T_1 , T_2 w funkcji czasu korelacji τ_c	40
Rys. 7 Warstwa powierzchniowa na granicy faz [Sarbak, 2000].....	48
Rys. 8 Porównanie modeli teoretycznych izoterm sorpcji, z prawej przedstawiona postać sigmaoidalna, z lewej paraboliczna. (...)	51
Rys.9 Schemat standardowego kalorymetru DSC. S – komora z próbką, R – komora wzorca, H_s i H_R to grzałki, H_s i H_R to termopary [Wróbel i Marzec, 2006].....	52
Rys. 10 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej próbek złożonej z „łodyżek” <i>Usnea aurantiaco-atra</i> dla różnych wilgotności względnych próbek.	58
Rys. 11 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej próbek złożonej z owocników <i>Usnea aurantiaco-atra</i> dla różnych wilgotności względnych próbek.	59
Rys. 12 Kinetyka hydratacji z fazy gazowej próbek plechy <i>Usnea aurantiaco-atra</i> dla różnych wilgotności względnych próbek.	59

Rys. 13 Izotermy sorpcyjne w postaci sigmoidalnej wraz z dopasowanymi modelami: linia zielona – model Denta (GAB), linia czerwona – model BET sporządzone dla fragmentów plech a) „łodyżek” b) owocników.	63
Rys. 14 Izoterma sorpcyjna w postaci sigmoidalnej wraz z dopasowanymi modelami (...)	64
Rys. 15 Izoterma sorpcyjna w postaci sigmoidalnej wraz z dopasowanymi modelami, (...)	66
Rys. 16 Przykładowe widma $^1\text{H-NMR}$ zarejestrowane dla próbek uwodnionych do poziomu a) $\Delta m/m_0 = 11\%$ b) $\Delta m/m_0 = 39\%$ c) $\Delta m/m_0 = 67\%$ (...)	68
Rys. 17 Szerokości połówkowe dopasowanej linii Gaussa $\Delta\nu_G$ oraz Lorentza $\Delta\nu_L$ w funkcji wzrastającego poziomu uwodnienia w zakresie od $\Delta m/m_0 = 9\%$ do 67%	69
Rys.18 Zależność hydratacyjna pola powierzchni pod linią Lorentza wyrażonej w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa wraz z dopasowaniem modelu funkcji wymiernej.	71
Rys. 19 Położenie pików Gaussa ν_G oraz Lorentza ν_L w funkcji wzrastającego poziomu hydratacji $\Delta m/m_0$	71
Rys. 20 Rodzina widm $^1\text{H-NMR}$ zarejestrowanych dla próbek uwodnionych do poziomu a) $\Delta m/m_0 = 67\%$ oraz b) 9% ; zmierzone w zakresie temperatur $295 - 215\text{ K}$	73
Rys. 21 Szerokości połówkowe dopasowanej linii Gaussa $\Delta\nu_G$ oraz Lorentza $\Delta\nu_L$ w funkcji spadającej temperatury w zakresie $295\text{ K} - 215\text{ K}$ dla próbek uwodnionych do poziomu a) $\Delta m/m_0 = 0.09$ b) $\Delta m/m_0 = 0.68$	74
Rys. 22 Zależność temperaturowa pola powierzchni pod linią Lorentza wyrażonego w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa dla próbek uwodnionych do poziomu: $\Delta m/m_0 = 9\%$ i b) $\Delta m/m_0 = 67\%$	75
Rys. 23 Zależność temperaturowa pola powierzchni pod linią Lorentza wyrażonego w jednostkach pola powierzchni pod linią Gaussa dla próbek uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 68\%$	76
Rys. 24 Położenie środków linii Gaussa x_{CG} oraz Lorentza x_{CL} w funkcji spadającej temperatury w zakresie $295\text{ K} - 215\text{ K}$ dla próbek uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 9\%$ (rys. lewy) oraz 68% (rys. prawy).....	76

Rys. 25 Sygnały zaniku swobodnej precesji $^1\text{H-NMR}$ dla próbki <i>U. aurantiaco-atra</i> zarejestrowane dla uwodnień z zakresu $\Delta m/m_0 = 0.02$ do 0.86 wraz z dopasowaniami.....	77
Rys. 26 Sygnały zaniku swobodnej precesji $^1\text{H-NMR}$ dla próbki <i>U. aurantiaco-atra</i> zarejestrowane dla uwodnień z zakresu $\Delta m/m_0 = 0.02$ do 0.70 wraz z dopasowaniami.....	78
Rys. 27 Porównie sygnałów zaniku swobodnej precesji FID zarejestrowanych dla tej samej próbki <i>Usnea aurantiaco-atra</i> uwodnionej do dwóch znacząco różnych poziomów uwodnienia (...).	79
Rys. 28 Zależność hydratacyjna czasów relaksacji sygnału zaniku swobodnej precesji FID dla próbki <i>U. aurantiaco-atra</i> . (...).	81
Rys. 29 Zależność hydratacyjna stosunku sumy amplitud sygnałów L_1 i L_2 w jednostce amplitudy sygnału S wraz z dopasowaną funkcją wymierną wg modelu.....	82
Rys. 30 Rozwinięcie w szereg składowej stałej sygnału FID dla nowej próbki <i>U. a-a</i> wykreślone w funkcji wzrastającego uwodnienia a) M_2 b) M_4	83
Rys. 31 Rozwinięcie w szereg składowej stałej sygnału FID dla nowej próbki <i>U. a-a</i> wykreślone w funkcji wzrastającego uwodnienia a) M_2 b) M_4	83
Rys. 32 Pomiar czasu relaksacji spinowo- sieciowej T_1 . Wybrane rodziny widm zarejestrowane dla próbki a) powietrznie suchej w temperaturze 215 K, b) powietrznie suchej w temperaturze 295 K, w funkcji odstępu τ między impulsami π oraz $\pi/2$	84
Rys. 33 Magnetyzacja spin-sieć dla składowych widm $^1\text{H-NMR}$: gaussowskiej i lorentzowskiej zarejestrowanych dla próbki powietrznie suchej w temp. pokojowej.	85
Rys. 34 Zależności temperaturowe czasu relaksacji spin-sieć T_1 dla powietrznie suchej próbki <i>Usnea a-a</i>	86
Rys. 35 a) Termogram DSC zarejestrowany przy tempie grzania $20^\circ\text{C}/\text{min}$ dla ogrzewania próbki plechy <i>T. complicatulum</i> (...)	87
Rys. 36 Termogramy DSC zarejestrowane po inkubacji w temperaturze -23°C przez 120 min dla ogrzewania próbki plechy <i>Cetraria aculeata</i> (...).....	88

Spis tabel

Tabela 1. Właściwości wybranych jąder atomowych wykorzystywanych w NMR (na podst. [Hennel 2004]	28
Tabela 2. Zestawienie wilgotności względnych nad powierzchniami przesyconych roztworów wybranych substancji.	55
Tabela 3. Porównanie uśrednionych parametrów kinetyki hydratacji dla badanych części plechy.....	60
Tabela 4. Parametry dopasowania modeli jedno- oraz dwueksponencjalnego do ścieżek hydratacyjnych zebranych dla badanych próbek: owocników, „łodyżek” i całych fragmentów plechy <i>U. a-a</i>	62
Tabela 5. Porównanie parametrów dopasowania modelu Denta dla badanych części plechy (łodyżki i owocniki).....	65