

Dr hab. Adam Rachocki, prof. IFM PAN
Instytut Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk
ul. Mariana Smoluchowskiego 17
60-179 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kijak
pt. „Badanie molekularnych mechanizmów odpornościowych na przemarzanie i wysuszenie
antarktycznego grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra*”

Praca doktorska mgr Pauliny Kijak jest pracą eksperymentalną i została wykonana w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr. hab. Huberta Harańczyka. **Rozprawa poświęcona jest badaniu procesów molekularnych odpowiedzialnych za specyficzną gospodarkę wodną porostów naskalnych z gatunku *Usnea aurantiaco-atra*.** Materiały do badań zostały pozyskane przez prof. dr hab. Marię Olech podczas ekspedycji antarktycznej Polskiej Akademii Nauk w 2002 roku z okolicy Polskiej Stacji Antarktycznej im. Henryka Arctowskiego, położonej nad Zatoką Admiralicji na Wyspie Króla Jerzego w archipelagu Szetlandów Południowych. Do chwili rozpoczęcia badań w 2017 roku próbki były przechowywane w zielniku Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego w stanie anhydrobiozy (wilgotność wzgl. powietrza ~30%, temp. pok.). Pewnym istotnym brakiem uporządkowania w tekście dysertacji odnoszącym się do pochodzenia materiałów wyjściowych może być fakt, że na str. 56 (ale również w podrozdziale 4.5 oraz we wnioskach końcowych na str. 95) pojawia się wzmianka o próbkach porostów zebranych do badań również w 2009 roku, o czym wcześniej, w szczególności we fragmencie na str. 54 odnoszącym się do źródła pochodzenia badanych materiałów (paragraf 3.1. *Przygotowanie próbek*), informacja ta nie została przez autorkę podana. Należy jednak przyjąć, że doktorantka dysponowała próbkami porostu z gatunku *Usnea aurantiaco-atra* pozyskanymi w dwóch różnych okresach (rok 2002 i 2009), z których to ostatecznie przygotowała **trzy zasadnicze rodzaje próbek do badań własnych: a) rozdrobnione fragmenty całej plechy porostów, b) oddzielone części plechy w formie owocników oraz c) fragmenty łodyżek pobrane z plechy.** Dla tak otrzymanych próbek przeprowadzony został proces hydratacji z fazy gazowej w kontrolowanej wilgotności względnej powietrza nad powierzchnią wody oraz przesyconych roztworów wybranych substancji (LiCl, KC₂H₃O₂, CaCl₂, K₂CO₃, Na₂Cr₂O₇, NH₄NO₃, Na₂S₂O₃, K₂CrO₃, Na₂SO₄). **Ostatecznie do dalszych badań doktorantka otrzymała szereg próbek różniących się zawartością wody.** Metodyka badań, jaka została zastosowana w pracy obejmowała określenie procesu kinetyki hydratacji próbek z wyznaczeniem i próbą teoretycznego opisu izoterm sorpcyjnych włącznie, wykorzystanie

kilku podstawowych technik pomiarowych z zakresu magnetycznego rezonansu jądrowego do próby opisu zróżnicowania dynamiki molekularnej cząsteczek wody zawartej w badanych układach.

W rozprawie liczącej 106 stron wyodrębnionych zostało 5 rozdziałów oraz wnioski i bibliografia zawierająca 52 pozycje. Rozdziały te poprzedzone zostały streszczeniem, w którym przedstawiono cel pracy, cytując: „Celem mojej pracy jest **poznanie procesu wiązania i zamarzania molekuł wody w próbkach antarktycznego grzyba zlichenizowanego z gatunku *Usnea aurantiaco-atra***”. Pierwsze dwa rozdziały (obejmujące około połowy objętości dysertacji) należy uznać za literaturowe, natomiast kolejne dotyczą części eksperymentalnej. Na końcu rozprawy zamieszczono spis rysunków oraz tabel.

Rozdział 1 poświęcony został ogólnemu wprowadzeniu i charakterystyce przedmiotu badań jakim były grzyby zlichenizowane. W tej części dysertacji autorka wyjaśnia czym są porosty, które jako organizmy złożone łączą cechy zarówno grzybów (mykobiontu), jak i glonów (fotobiontu), co niewątpliwie czyni je fascynującym przykładem symbiozy w świecie przyrody. To grzyb dostarcza glonowi strukturę oraz ochronę, a także pomaga w utrzymaniu wilgotności, co jest istotne dla fotosyntezy, której głównym „wykonawcą” jest z kolei samożywny glon wytwarzający w tym procesie substancje organiczne (m.in. węglowodany), które są przekazywane grzybowi. Dzięki szczególnej interakcji grzyba i glonu porosty cechuje wyjątkowa zdolność do adaptacji i utrzymania funkcji życiowych w ekstremalnie trudnych warunkach środowiska naturalnego (zarówno w skrajnie niskich, jak i wysokich temperaturach). Z tego punktu widzenia prowadzone w ramach doktoratu **badania nad szeroko rozumianą gospodarką wodną porostów**, choć zaliczane do niszowych, to w szczególności w kontekście wykorzystania grzybów zlichenizowanych jako bioindykatorów zanieczyszczeń środowiska należy uznać za interesujące. Moja zasadnicza uwaga krytyczna odnosząca się do zawartości rozdziału 1 związana jest z poglądowym rysunkiem zamieszczonym na stronie 16 (Rys. 1). Jego celem miało być zapewne ułatwienie czytelnikowi zrozumienia budowy i struktury grzyba zlichenizowanego, jednak brak polskich opisów to utrudnia.

Rozdział 2 jest kontynuacją części literaturowej dysertacji, w którym obszerny fragment poświęcony został głównej metodzie badawczej, jaką był **magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)**. W tej części opracowania czytelnik zapoznaje się z podstawowymi pojęciami służącymi do opisu zjawiska absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez układ spinów jądrowych w warunkach zewnętrznego pola magnetycznego oraz towarzyszącemu temu zjawisku procesowi relaksacji. Pod kątem badanych próbek omówiony został również główny mechanizm magnetycznej relaksacji jądrowej (oddziaływanie dipolowe) oraz kształt linii rezonansowej. Nie do końca zrozumiałą jest dla mnie zapis na stronie 41, gdzie autorka stwierdza, cytując: „Temperatura ma duży wpływ na kształt linii NMR, ponieważ wzrost temperatury aktywuje ruchy od drgających przez rotacyjne aż po translacyjne, co prowadzi do zwężenia się linii widma w przypadku cieczy, **a rozszerzenia w przypadku ciał stałych**”. W dalszej części rozdziału autorka skupia się na wyjaśnieniu zjawiska

fizysorpcji oraz przeprowadza dyskusję nad głównymi modelami teoretycznymi służącymi do opisu izoterm sorpcyjnych. W końcowym fragmencie rozdziału została wyjaśniona inna z metod badawczych, tj. skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), przy czym metoda ta została wykorzystana przez autorkę do badania zupełnie innych porostów niż „tytułowy bohater” dysertacji. W kontekście spójności otrzymanych wyników jest to niezrozumiałe.

O ile od strony merytorycznej zawartość rozdziału 2 jest uporządkowana i ogólnie zrozumiała dla czytelnika, o tyle strona redakcyjna (również i językowa) budzi niestety moje zastrzeżenia. W rozdziale tym, ale również i w całej pracy, napotkać można wiele określeń, które należy zakwalifikować raczej do żargonowych, np.: „jądra parzysto-nieparzyste”, „jądra zaczynają wykonywać ruch precesyjny”, „magnetyzacja próbki jest równoległa”, cewka nadawczo-odbiorcza „podająca impuls NMR”, „mobilna składowa sygnału”, „zmierzono widma ^1H NMR” itp. Dyskutowałbym również z określeniami typu: „udział danej puli protonowej”, „pula wody zapuławkowana w porach”, woda „ściśle/luźno” związana. Od strony edytorskiej wytknąć należy brak w wielu miejscach polskich znaków lub pojedynczych liter w wyrazach, a nawet wyrazów w zdaniach. Przykładowo na stronie 49 autorka pisze: „Historycznie pierwszy model został opracowany Langmuira na początku XX wieku.”. Odnośnie do modelu Langmuira „wpadka redakcyjna” występuje również w podpisie pod Rys. 8 (str. 51). Kolejną zauważalną usterką są pomyłki we wzorach lub w oznaczeniu niektórych wzorów, bądź błędne wskazanie numeracji wzorów w tekście, przykładowo: str. 30 – „Stosunek liczby obsadzeń możemy policzyć na podstawie wzoru (8)” (zapewne chodzi o wzór nr 7); str. 34 – we wzorze (25) brakuje ujemnego znaku w wykładniku; str. 43 – błędne oznaczenie wzoru w pierwszym zdaniu przedostatniego akapitu; analogiczna uwaga dotyczy zapisu pod wzorem (61) lub przed wzorem (62). Nagminnym niedociągnięciem w całej dysertacji jest pozostawianie pojedynczych liter na końcu wierszy, brak w odpowiednich miejscach kropek w przypadku numeracji podrozdziałów czy numeracji poszczególnych rysunków. Tylko nieliczne rysunki (np. Rys. 20 na str. 73) zawierają oznaczenie a), b) lub c), natomiast w zdecydowanej większości przypadków takiego oznaczenia brakuje, przy czym w podpisach pod rysunkami i w samym tekście oznaczenia te są stosowane. Ponadto w tekście w kilku miejscach można dostrzec niepoprawne przypisanie numeracji rysunków. Można również wnieść zastrzeżenia, co do wielkości niektórych rysunków, które powinny być znacznie większe (np. Rys. 24 na str. 76). Niestety od strony redakcyjnej praca jest niedopracowana.

Rozdział 3 jest trzystronicowym fragmentem poświęconym preparatyce próbek, które posłużyły doktorantce do badań oraz zawiera informacje o wykorzystanych metodach eksperymentalnych. Jak już wspominałem we wstępie niniejszej recenzji, warto aby autorka dysertacji doprecyzowała, jakie dokładnie były źródła pochodzenia grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra*, jako materiału wykorzystanego do badań, gdyż na podstawie różnych fragmentów pracy można wnioskować, że były co najmniej dwa (materiał pochodzący z okolic Polskiej Stacji Antarktycznej im. Henryka Arctowskiego

zebrany w roku 2002 i 2009), natomiast uwzględniając pomiary DSC – zapewne więcej. Jeśli chodzi o ustalony czas repetycji (TR) podczas rejestracji widm ^1H NMR dla wysokiej częstotliwości rezonansowej (300 MHz), to wynosił on 2 s. Zastanawiam się, czy czas ten nie był zbyt krótki (w tego typu układach standardowo stosuje się TR co najmniej 5 s), co mogłoby w niekorzystny sposób wpłynąć na niepoprawne odwzorowanie kształtu widm NMR, które następnie poddawane były analizie pod kątem wyodrębnienia poszczególnych składowych, na podstawie których wyznaczano ostatecznie różne parametry fizyczne. Z czasem repetycji 5 s był natomiast rejestrowany sygnał zaniku swobodnej precesji (FID) przy niskiej częstotliwości rezonansowej (30 MHz), który to sygnał również był poddawany szczegółowej analizie i interpretacji. W przypadku tego typu pomiarów nie mam natomiast uwag, co do prawidłowo zastosowanych tzw. „twardych”, krótkich impulsów wzbudzających $\pi/2$ o czasie trwania ustalonym na poziomie pojedynczych mikrosekund, co pozwoliło wzbudzić układ spinów w możliwie szerokim zakresie widmowym.

W rozdziale 4 znajduje się opis otrzymanych przez autorkę wyników doświadczalnych. W podrozdziale 4.1 opisano kinetykę hydratacji z fazy gazowej poszczególnych próbek z podziałem na fragmenty łądźek, owocniki oraz niepoddaną fragmentacji plechę porostu. W tym celu przeprowadzono dopasowania prostych funkcji eksponencjalnych do danych doświadczalnych. Na podstawie otrzymanych wyników autorka postuluje występowanie w badanych układach, w zależności od poziomu ich uwodnienia, **dwóch lub trzech frakcji wody**: i) frakcja wody **najsilniej** (dla autorki „najsłbiej”) **związana** z powierzchnią matrycy plechy (jest to frakcja odporna na usunięcie w warunkach inkubacji nad żelem krzemionkowym w temperaturze pokojowej, natomiast możliwa do usunięcia podczas długotrwałego wygrzewania w temperaturze 70°C), ii) frakcja wody **silnie** (dla autorki „ściśle”) **związanej** z powierzchnią oraz iii) frakcja wody **słabo** (dla autorki „luźno”) **związanej** (dotyczy próbek o wilgotności względnych powyżej 88%). Tak zaproponowana identyfikacja frakcji wody kłóci się jednak z przyjętą metodologią, gdzie zastosowano model jedno- lub dwueksponencjalny. Oznaczać może to tylko jedno, że w przypadku dopasowań z wykorzystaniem funkcji jednoeksponencjalnej **nie jest możliwy podział frakcji wody z rozróżnieniem na siłę oddziaływania (związania) z matrycą**, natomiast obserwowany jest jedynie proces uśredniony. Prosiłbym autorkę o komentarz w tej kwestii.

W podrozdziale 4.2 określony wcześniej całkowity poziom hydratacji nasyceniowej próbek został wykorzystany do wyznaczenia izoterm sorpcyjnych, do opisu których wykorzystano dwa modele teoretyczne – klasyczny model BET (zaproponowany w 1938 r. przez Brunauera, Emetta i Teller) oraz model sorpcji wielowarstwowej Denta (1977 r.). Ostatni z wymienionych modeli znacznie lepiej opisywał dane w całym zakresie analizowanych uwodnień. Odnosząc się do tej części prezentowanych wyników nie potrafię zrozumieć wyciągniętego przez autorkę kluczowego wniosku (str. 91), iż „Masa wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące [...]” może być utożsamiona „jako frakcja wody

wysycająca pierwotne miejsca wiążące w próbce". Takie stwierdzenie jest pleonazmem. Czy chodziło może o powiązanie **cząsteczek wody wysycających pierwotne miejsca wiążące z frakcją wody najsilniej oddziałujących z matrycą stałą plechy porostu?**

W podrozdziałach 4.3 i 4.4 przeprowadzona została analiza kształtu widm ^1H NMR dla próbek o poziomie uwodnienia z przedziału 9-67%. Próbki do badań NMR były przygotowane w odmienny sposób niż te, które posłużyły do określenia kinetyki hydratacji. Trudno doczytać się, jakie dokładnie fragmenty plechy porostu były poddane badaniom NMR. Można jedynie przyjąć, że chodziło w tym przypadku o całe fragmenty plechy, tj. nie poddane fragmentacji. Dekompozycja widm została przeprowadzona pod kątem wyszczególnienia **tzw. składowej ciałostalowej** (linia Gaussa) powiązanej z frakcją protonów matrycy plechy (tzw. frakcja „sztywna”) – nawiasem mówiąc, we wzorze (74) na str. 72 nie ujednolicono indeksów „S” oraz „G” – oraz **tzw. składowej cieczowej** (linia Lorentza), którą można przypisać protonom wody zawartej w plesze oraz, jak słusznie zauważa autorka, częściowo protonom frakcji lipidowej (tzw. frakcja „mobilna”). Jest to bardzo cenna uwaga, która zasługuje na podkreślenie, gdyż przypisanie w tym przypadku składowej cieczowej widma ^1H NMR jedynie protonom cząsteczek wody byłoby nieakceptowalnym uproszczeniem. Taki błąd popełniano przez wiele lat podczas analizy widm ^1H NMR rejestrowanych np. dla próbek nasion roślin oleistych, gdzie pomijano istotny wkład do sygnału NMR pochodzący od protonów frakcji kwasów tłuszczowych.

Ciekawym wynikiem tej części badań wydaje się być zaobserwowanie zwężenia linii rezonansowej przypisanej protonom frakcji mobilnej, którą to zmianę zaobserwowano w funkcji rosnącego poziomu uwodnienia próbek (Rys. 17 na str. 69). Autorka stwierdza przy tym, że sygnał ten, cytując: „nie odzwierciedla pojedynczej frakcji wody, ale wydaje się uśredniać frakcje wody ściśle i luźno związanej znajdujące się w reżimie szybkiej wymiany”. Mimo, że uwzględnienie tzw. szybkiej wymiany protonów pomiędzy frakcją wody silnie i słabo związanej z matrycą plechy jest jak najbardziej słuszną koncepcją, należy jednak wskazać na brak pewnej spójności z wcześniej omawianymi wynikami, gdzie w przypadku określania kinetyki hydratacji próbek całej plechy porostu **trudno było postulować obecność frakcji wody słabo związanej dla próbek z przedziału uwodnienia poniżej 76%** – stosowano wówczas opis krzywej hydratacji z wykorzystaniem modelu jednoeksponencjalnego (Tabela 4 na str. 62).

Innym istotnym aspektem przeprowadzonych badań było zarejestrowanie widm ^1H NMR w funkcji temperatury dla dwóch próbek zasadniczo różniących się poziomem uwodnienia, tj. dla próbki powietrznie suchej, gdzie poziom hydratacji wynosił 9% oraz dla próbki uwodnionej na poziomie hydratacji 67%. W trakcie stopniowego obniżania temperatury od pokojowej do około -60°C dla obu badanych próbek zaobserwowano charakterystyczny, a zarazem zróżnicowany wzrost szerokości linii rezonansowych przypisanych protonom obydwu frakcji (sztywnej i mobilnej) – Rys. 21 (str. 74). Świadczy to o spowalnianiu dynamiki molekularnej zarówno cząsteczek przechłodzonej wody,

jak i cząsteczek wchodzących w skład matrycy plechy porostu. Ponadto dowiedziono, że próbka o małej zawartości wody może wykazywać większą efektywność mechanizmów zabezpieczających przed niszczącym tkanki procesem zamarzania wody w porowatej strukturze matrycy plechy – w tym przypadku nie zaobserwowano przejścia fazowego pierwszego rodzaju (Rys. 22; str. 75). **Wynik ten, który uważam za jeden z bardziej wartościowych w niniejszej rozprawie doktorskiej, świadczy o silnym oddziaływaniu stosunkowo niewielkiej liczby cząsteczek wody z matrycą plechy, co wyklucza inicjację procesu krystalizacji i jednocześnie zabezpiecza tego typu struktury biologiczne przed procesami destrukcyjnymi.**

W podrozdziale 4.5 podjęto próbę opisu dynamiki molekularnej badanych układów poprzez analizę czasów magnetycznej relaksacji jądrowej w funkcji uwodnienia ($\Delta m/m_0$ w przedziale od 0.02 do 0.86) bądź w funkcji temperatury (od 22 do -57°C). Zależności hydratacyjne **tzw. efektywnych czasów relaksacji T_2^*** protonów wyznaczono na podstawie kształtu sygnału zaniku swobodnej precesji (FID) dokonując dekompozycji sygnału na dwie bądź trzy składowe, odpowiednio dla próbek o niższym i wyższym poziomie uwodnienia. W każdym z tych przypadków składową gaussowską sygnału FID przypisywano protonom należącym do matrycy stałej plechy, natomiast składową/składowe lorentzowskie – protonom frakcji mobilnej (dotyczy cząsteczek wody i lipidów), z podziałem na frakcję silnie oraz słabo związaną z powierzchnią plechy porostu. Takie podejście w celu określenia paramentów dynamicznych układu molekularnego, choć stosunkowo proste, należy obecnie do mocno przestarzałego i wiąże się z szeregiem ograniczeń, które wynikają chociażby z niewystarczających możliwości rozdzielczych zastosowanej metody. Znacznie lepszą strategią badawczą byłoby **wykorzystanie możliwości techniki wirowania próbki pod tzw. kątem magicznym (technika MAS NMR, od ang. *magic angle spinning*)**, gdzie przy stosunkowo niewielkiej częstotliwości wirowania rotorów wypełnionych tego typu układami (2-3 kHz) możliwe byłoby uzyskanie widma ^1H NMR o wysokiej rozdzielczości, przypuszczalnie z rozdzieleniem sygnałów pochodzących od cząsteczek wody występującej w różnym stanie oddziaływania z powierzchnią matrycy oraz protonów innych frakcji charakteryzujących się stosunkowo dużą dynamiką molekularną. Niemniej bazując na wynikach otrzymanych przez autorkę możliwe było wyróżnienie jedynie na poziomie ogólnym trzech zasadniczych grup cząsteczek różniących się ruchliwością. Przedstawione na Rys. 28 (str. 81) zależności hydratacyjne czasów relaksacji T_2^* nie pozwalają jednak w mojej ocenie na wyciągnięcie bardziej szczegółowych wniosków. Zapewne z tego też względu autorka zdecydowała się na poszerzenie dyskusji na temat otrzymanych wyników, a w szczególności w odniesieniu do składowej całostalowej sygnału FID (linia Gaussa). W tym celu na podstawie kształtu sygnałów FID przeprowadziła analizę tzw. momentów linii. W podejściu tym, równie rzadko dziś praktykowanym, istotne są głównie momenty drugiego (M_2) i czwartego rzędu (M_4). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że zdecydowanie bardziej optymalnym podejściem stosowanym przy odwzorowaniu pełnego zaniku sygnału swobodnej precesji jest metoda tzw. „solid-echa”, która pozwala na wyeliminowanie

niekorzystnego wpływu czasu martwego spektrometru na początkowy fragment sygnału FID. Autorka nie skorzystała jednak z tej techniki pomiarowej i zarówno M_2 jak i M_4 wyznaczyła drogą rozwinięcia funkcji (składowej gaussowskiej sygnału FID) w szereg momentów – wzór (51) na str. 43. Na Rys. 30 i 31 (str. 83) zestawione zostały zależności dla dwóch badanych próbek; nawiasem mówiąc autorka wprowadziła tu dodatkowe określenia – próbka „stara” i „nowa”, prawdopodobnie odnosząc się do okresu pozyskania materiału badawczego w roku 2002 i 2009. Z uwagi na identyczny opis pod ww. rysunkami proszę o doprecyzowanie, do której próbki należy odnieść poszczególne wyniki. Ponadto na podstawie otrzymanych zależności autorka stwierdza na str. 82, cytując: „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** [...]”. Trudno mi się zgodzić ze stanowiskiem, że stała część plechy porostu, stanowiąca jego porowatą i ustrukturyzowaną matrycę, na skutek większego poziomu hydratacji miałaby ulegać stopniowemu rozpuszczaniu. Oczekiwałbym raczej, że w tym przypadku cząsteczki wody mogą pełnić również rolę „plastifikatora” i stąd wynika wyraźna zmiana dynamiki matrycy w skutek zwiększonego uwodnienia układu. Prosiłbym o komentarz w tej sprawie.

Kontynuacją prezentacji wyników powiązanych z badaniem dynamiki molekularnej jest podrozdział 4.6, gdzie autorka przedstawiła temperaturowe zależności **czasów relaksacji spin-sieć** (T_1) dla powietrznie suchej próbki plechy porostu ($\Delta m/m_0 = 0.09$). Czasy relaksacji wyznaczono metodą odrostu magnetyzacji od odwrócenia, na podstawie analizy pola powierzchni pod widmem ^1H NMR oraz po uwzględnieniu składowej ciałostalowej (linia Gaussa) oraz cieczerwowej (linia Lorentza). Otrzymane wyniki zestawiono na Rys. 34 (str. 86). Autorka zaznacza, że na zależnościach nie zaobserwowano charakterystycznego minimum, które pozwoliłoby na oszacowanie średniej odległości między protonami cząsteczek wody zawartej w badanej próbce. W przypadku materiałów o charakterze biologicznym oczekiwanie to jest moim zdaniem nad wyraz optymistyczne z uwagi na stopień skomplikowania tego typu układów, co rzutuje m.in. na wyjątkowo złożoną i zdywersyfikowaną dynamikę cząsteczek wody. Zwracam przy tym uwagę chociażby na wartości energii aktywacji, które zarówno dla pierwszego z wymienionych procesów molekularnych (dynamika frakcji mobilnej), jak i drugiego (dynamika frakcji sztywnej – porowatej matrycy), autorka próbowała oszacować z nachylenia zależności $\ln T_1(1/T)$. Wyznaczone wartości energii aktywacji są jednak zbliżone i wynoszą około 11 kJ/mol; wynik ten trudno tak naprawdę pozytywnie skomentować, czy odnieść do innych struktur biologicznych. Ponadto w przypadku analizy magnetycznej relaksacji protonów zabrakło mi dyskusji na temat bardzo istotnego mechanizmu relaksacji, jakim może być w tym przypadku **reorientacja molekuł wywołana dyfuzją translacyjną – model RMTD** (od ang. **Reorientation Mediated by Translational Diffusion**). Model ten doskonale sprawdza się w wielu układach prowatych, gdzie w literaturze przedmiotu często omawiana jest dyfuzja cząsteczek

rozpuszczalnika (bądź wypełniacza) wzdłuż silnie rozwiniętych powierzchni matrycy. Uważam, że podobna sytuacja może występować w przypadku uwodnionej matrycy porostów. Jednakże w celu dokładnego poznania tego typu procesów molekularnych konieczne jest zastosowanie bardziej zaawansowanych technik pomiarowych, np. **relaksometrii fast-field cycling NMR**, gdzie czas relaksacji T_1 wyznaczany i analizowany jest w funkcji pola magnetycznego wyrażonego w jednostkach częstotliwości rezonansowej. Inną metodą, której mi osobiście zabrakło w przyjętej metodologii jest **dyfuzjometria NMR**, która pozwala na wyznaczanie współczynników samodyfuzji na podstawie analizy zaniku sygnału echa spinowego w funkcji gradientu pola magnetycznego. Wykorzystanie wymienionych powyżej metod badawczych mogłoby dostarczyć wielu cennych i szczegółowych informacji zarówno o dynamice molekularnej, jak i oddziaływaniach występujących w porowatej i uwodnionej strukturze porostów. Wydaje się, że lepsze poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za odporność na przemarzanie czy dehydratację mogłoby mieć ważne zastosowania praktyczne, np. w przemyśle rolno-spożywczym (przechowywanie produktów rolnych, ochrona roślin przed suszą), czy w medycynie, w szczególności w transplantologii (przechowywanie organów przeznaczonych do przeszczepów).

Rozprawę doktorską zamykają dwa końcowe rozdziały, przy czym kilkunastopiętnastopiętny rozdział 4 poświęcony został krótkiej dyskusji wyników, do której w niniejszej recenzji wielokrotnie się odnosiłem, natomiast w rozdziale 5 przedstawiono wnioski końcowe, z których w mojej ocenie na szczególną uwagę zasługuje wniosek nr 6 dotyczący dwóch odmiennych procesów (kooperatywnego i niekooperatywnego) związanych z ograniczeniem ruchliwości cząsteczek wody w porowatej strukturze matrycy porostu w zależności od stopnia jej uwodnienia. Jak już zasygnalizowałem wcześniej, nie mogę natomiast zgodzić się z wnioskiem nr 5, gdzie wzrost sygnału NMR pochodzący od protonów frakcji mobilnej tłumaczony jest obecnością rozpuszczonej frakcji matrycy stałej porostu. Pozostałe z wymienionych wniosków wydają się być w zgodzie z otrzymanymi wynikami i przeprowadzoną analizą.

Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska mgr Pauliny Kijak zatytułowana: „Badanie molekularnych mechanizmów odpornościowych na przemarzanie i wysuszenie antarktycznego grzyba zlichenizowanego *Usnea aurantiaco-atra*”, co do której moja opinia jest miejscami krytyczna, zawiera jednak szereg walorów merytorycznych i poznawczych, które przewyższają wszelkie niedoskonałości (w tym redakcyjne czy ewentualne oczekiwanie recenzenta co do zastosowania bardziej wyrafinowanych technik pomiarowych do badania tego typu układów) i tym samym stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane pracom doktorskim zawarte w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce* (Dz. U. 2018 poz. 1668, z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie mgr Pauliny Kijak do publicznej obrony.