

Łódź, dnia 05.10.2023 r.

Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii,
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Bojke

**„Zmienność składu chemicznego lotnych i średniolotnych związków
wytwarzanych przez wybrane gatunki owadów pod wpływem infekcji
grzybiczych”**

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest pismo Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne, Pana dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego, prof. UG z dnia 06.07.2023 r., w którym zostałam poinformowana o powierzeniu mi decyzją Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne, podjętą na posiedzeniu w dniu 5.07.2023 r., funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Bojke zatytułowanej „Zmienność składu chemicznego lotnych i średniolotnych związków wytwarzanych przez wybrane gatunki owadów pod wpływem infekcji grzybiczych”

Ocena formalna

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Bojke została przygotowana w Katedrze Analizy Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Marka Gołębiowskiego, prof. UG.

Praca ma formę monografii, której struktura jest zgodna z wymogami i ogólnymi zasadami stawianymi rozprawom doktorskim. Tytuł pracy doktorskiej odpowiada zawartości merytorycznej. W rozprawie Autorka zamieściła streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie, przegląd literatury, cel pracy, opis części doświadczalnej, opis wyników i ich dyskusję, podsumowanie oraz wnioski, a także literaturę i informacje o dorobku naukowym. Całość dysertacji obejmuje 246 stron.

Wstęp do dysertacji jest kompletny i wyczerpująco wprowadza w problem badawczy, natomiast zaproponowany przez Doktorantkę główny cel pracy jest jasno sformułowany i poparty celami szczegółowymi. Metodologia została opisana w pracy w sposób prawidłowy. Wyniki przedstawiono na licznych tabelach, rycinach i wykresach w sposób bardzo przejrzysty i przedyskutowano w świetle aktualnej literatury dotyczącej tego tematu. Piśmiennictwo, na które powołuje się w dysertacji mgr Aleksandra Bojke, obejmuje najnowsze pozycje literaturowe dotyczące prezentowanego tematu, jest dobrze dobrane i merytorycznie uzasadnione. W końcowej części pracy Autorka przedstawia podsumowanie osiągniętych w dysertacji wyników, jak również wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Ponadto przedstawia dalsze możliwości kontynuowania zapoczątkowanych przez nią badań.

Monografia stanowiąca podstawę rozprawy doktorskiej została napisana poprawnie pod względem stylistycznym, leksykalnym i gramatycznym i stanowi bardzo uporządkowane opracowanie właściwe pracom naukowym.

Ocena merytoryczna

Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyka niezwykle istotnego problemu jakim są interakcje pomiędzy grzybami entomopatogenicznymi i stawonogami. Należy podkreślić, że rozprawa doktorska mgr Bojke przedstawia innowacyjne ujęcie tych relacji.

Grzyby entomopatogeniczne to mikroorganizmy, które biorą udział w biokontroli populacji stawonogów w środowisku naturalnym. Drobnoustroje te są zróżnicowane filogenetycznie i taksonomicznie, ale w warunkach naturalnych najczęściej spotykane są gatunki zaliczane do workowców (Ascomycota), które są również przedmiotem niniejszej rozprawy. Pomimo długotrwałych badań naukowych prowadzonych w kilku

ośrodkach na świecie, w dalszym ciągu istnieją luki w wiedzy dotyczące funkcjonowania barier i mechanizmów obronnych owadów skierowanych przeciwko patogenom grzybowym. Dokładne poznanie tych wyżej wymienionych czynników może przyczynić się do stworzenia nowych, przyjaznych dla środowiska naturalnego metod umożliwiających zwalczanie stawonogów niszczących plony lub zagrażających ludziom i zwierzętom. Drugim, rzadko eksplorowanym obszarem badawczym, jest identyfikacja substancji wydzielanych przez owady o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Związki te jako substancje aktywne, mogą w przyszłości znaleźć szerokie zastosowanie terapeutyczne. W związku z tym, badania zróżnicowania lotnych i średniolotnych związków organicznych wytwarzanych przez owady pod wpływem infekcji grzybiczej wpisują się w aktualny nurt badań prowadzonych na świecie.

Opisane w dysertacji badania obejmują gatunki grzybów, które nie tylko pełnią ważne role ekologiczne w biokontroli naturalnych populacji owadów, ale także zostały dopuszczone do produkcji biopreparatów stosowanych w ochronie roślin uprawnych. Dlatego też, badania przeprowadzone przez Doktorantkę poszerzają wiedzę nie tylko w zakresie chemii, ale i patologii owadów.

Istotę tej problematyki Doktorantka omawia w 14 stronicowym wprowadzeniu cytując przy tym aktualną literaturę dotyczącą omawianego tematu. Następnie mgr Aleksandra Bojke definiuje cel badawczy rozprawy, który brzmi: „Określenie wpływu infekcji grzybiczej na zmiany składu lotnych i średniolotnych związków wytwarzanych przez wybrane gatunki owadów”. Materiałem w przeprowadzonych badaniach były popularnie stosowane w badaniach naukowych gatunki owadów takie jak *Galleria mellonella* i *Tenebrio molitor* oraz występujące w naszej strefie klimatycznej *Hylobius abietis*, *Zophobas morio*, *Periplaneta americana* i *Calliphora vomitoria*. Ponadto, Doktorantka wykorzystwała grzyby entomopatogeniczne zaliczane do rodzajów *Metarhizium*, *Beauveria* i *Cordyceps* (dawniej *Isaria*), które są stosowane do produkcji biopreparatów na całym świecie.

Do realizacji zamierzonego celu Doktorantka zaproponowała 6 zadań badawczych, które obejmują: (I) zbadanie zmian składu średniolotnych związków w owadach przed i po infekcji grzybiczej, (II) ustalenie zmian składu średniolotnych związków w ciele tłuszczowym przed i po infekcji grzybiczej, (III) zbadanie zmian składu lotnych związków wytwarzanych przez owady przed i po infekcji grzybiczej oraz

dobór najlepszych warunków analizy lotnych związków z zastosowaniem mikroekstrakcji do fazy stałej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME), jak również wyznaczenie najważniejszych parametrów walidacyjnych analizy HS-SPME/GC-MS (IV) wytypowanie związków, które prawdopodobnie są syntezowane (lub pobierane wraz z pożywieniem) jako odpowiedź obronna na infekcję grzybiczą, połączone z badaniami składu metabolitów wtórnych wytwarzanych przez grzyby entomopatogeniczne, (V) wskazanie związków wykorzystywanych przez owady do obrony przed infekcją grzybiczą, (VI) określenie zależności między profilami związków wytwarzanych przez badane gatunki owadów przed i po infekcji grzybiczej z zastosowaniem analizy głównych składowych (PCA).

Część doświadczalna dysertacji jest zaprezentowana w sposób przejrzysty. Doktorantka wymienia wykorzystywane w badaniach odczynniki i materiały. Szczegółowo opisuje zastosowane metody badawcze, w tym metody ekstrakcji oraz oznaczania badanych substancji technikami GC-MS i HS-SPME/GC-MS.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki umożliwiły określenie zależności między profilami związków wytwarzanych przez badane gatunki owadów, a tym samym poszerzyły wiedzę naukową w tym zakresie. Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki są wieloaspektowo i precyzyjnie analizowane, a także szczegółowo opisane, co stanowi istotny walor ocenianej dysertacji. Autorka w sposób właściwy interpretuje uzyskane przez siebie wyniki, porównując je do nielicznych w tym temacie danych literaturowych. Ponadto, wskazuje potencjalne implikacje praktyczne uzyskanych rezultatów, demonstrując w ten sposób dojrzałość naukową. Wyniki oraz dyskusja przedstawione w dysertacji potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktorantki na temat przedstawionego problemu badawczego.

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr Bojke zaliczam:

1. Wykazanie, że w organizmach owadów znajdują się liczne związki chemiczne zaliczane między innymi do kwasów tłuszczowych, tzw. „innych kwasów”, estrów, monoacylogliceroli, aminokwasów, alkoholi, steroli, przy czym zidentyfikowano aż 27 kwasów tłuszczowych, spośród których w największej ilości występowały kwasy palmitynowy, stearynowy, oleinowy oraz linolowy.
2. Potwierdzenie występowania w ciele tłuszczowym larw *G. mellonella* oraz *T. molitor* estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) jako dominującej

grupy związków, natomiast w ciele tłuszczowym pozostałych badanych owadów kwasów tłuszczowych. Ponadto, wykazanie obecności węglowodorów tylko w ciałach tłuszczowych larw *G. mellonella* oraz *T. molitor*.

3. Identyfikacja 92 różnorodnych związków chemicznych w larwach owadów przed i po infekcji grzybiczej.
4. Wykazanie występowania różnic w składzie wytwarzanych lotnych i średniolotnych związków chemicznych przez owady niezainfekowane i zainfekowane grzybami.
5. Potwierdzenie, że profil i skład związków chemicznych w owadach zarażonych jest powiązany z gatunkiem grzybów jakim były infekowane owady.
6. Identyfikacja związków syntezowanych przez owady i powiązanie ich obecności z infekcją grzybiczą w owadach.
7. Wykazanie, że podczas infekcji następuje ubytek związków niezbędnych do prawidłowego rozwoju owadów
8. Wskazanie, które z przebadanych aldehydów wytwarzanych przez owady mają właściwości fungistatyczne i mogą stanowić ochronę przed atakiem grzybów entomopatogenicznych.

Sugestie, uwagi i pytania.

Po analizie ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące sugestie, uwagi i pytania:

1. W mojej ocenie jeden z celów szczegółowej pracy „zbadanie zmian składu średniolotnych związków w ciele tłuszczowym owadów 24, 48 i 72 godz. przed i po infekcji grzybiczej” jest niejasno sformułowany. Z powyższego zdania wynika, że badania były prowadzone zarówno 24, 48 i 72h przed i po infekcji. Bardzo proszę o wyjaśnienie.
2. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała do ekstrakcji włókno DVB/CAR/PDMS. Chciałam zapytać, w jakiej temperaturze wykonano porównanie sorpcji aldehydów do różnych rodzajów włókien (Rys. 69, str. 120) i czy przeprowadzenie analizy w różnych warunkach temperaturowych nie mogłoby zaowocować wyborem innego, być może lepszego, sorbentu?
3. W części 4.3.4. przebadano aktywność przeciwgrzybiczą aldehydów wobec grzybów entomopatogenicznych. Moje pytanie dotyczy grzyba

Gibellula suffulta - czym podyktowany był wybór tego grzyba do badań? Należy zaznaczyć, pozostałe gatunki grzybów są nie tylko izolowane w naszej strefie klimatycznej, ale też stanowią składnik biopreparatów, natomiast wyżej wymieniony drobnoustrój nie jest składnikiem biopreparatów, a ponadto atakuje pajęczaki, a nie owady stanowiące przedmiot rozprawy.

4. W tej samej części rozprawy, na stronie 142, w opisie wyników stwierdzono, że 2,4-dekadienal powoduje brak wzrostu grzybów, co nie wynika z danych przedstawionych w tabeli 11. Proszę o komentarz w tej sprawie. Ponadto, chciałam zapytać czemu nie zbadano mieszaniny wszystkich wytwarzanych przez owady aldehydów, co mogłoby dać lepsze rezultaty?
5. W części wynikowej pracy autorka wielokrotnie wspomina, że produkowane przez grzyby związki są metabolitami wtórnymi. Należy zaznaczyć, że prawie wszystkie z omawianych w dysertacji związków są produktami metabolizmu pierwotnego. Z czego wynika stosowanie przez Autorkę stwierdzenia „metabolizm wtórny”?
6. Na str. 159 dysertacji, Autorka twierdzi, że oznaczane aminokwasy nie występują w komórkach grzybów entomopatogenicznych. Jest to zaskakujące, gdyż wszystkie aminokwasy są na pewno obecne we wszystkich żywych komórkach, w tym w komórkach badanych grzybów. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego nie udało się wykazać obecności tych związków u badanych grzybów?
7. W Dysertacji, Autorka wspomina, że związki izolowane z owadów mogą w przyszłości być stosowane jako substancje przeciwnowotworowe. Poproszę o podanie przykładów takich związków o ile zostały opisane już w literaturze.
8. Autorka na str. 220 we wniosku nr 19 podnosi konieczność dalszych badań mających na celu określenie funkcji oznaczanych przez nią związków chemicznych u owadów oraz sugeruje, że związki te można by wykorzystać w medycynie, np. jako związki wspomagające działanie preparatów przeciwgrzybiczych lub w rolnictwie, np. jako biopestycydy. W związku z

tym chciałam zapytać, zgodnie z obecną wiedzą, który związek Doktorantka by wytypowała do dalszych badań?

PODSUMOWANIE

Reasumując, dysertacja mgr Aleksandry Bojke stanowi zbiór interesujących wyników dotyczących odpowiedzi owadów na infekcje grzybicze, co jest ważnym i aktualnym problemem naukowym. Przeprowadzone w trakcie realizacji pracy doktorskiej eksperymenty zostały wykonane przy użyciu odpowiednich technik, które pozwoliły na uzyskanie istotnych i wartościowych wyników. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można sądzić, że mgr Aleksandra Bojke zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Należy również zauważyć, że Doktorantka w swoim dorobku naukowym posiada 11 publikacji, była kierownikiem 5 projektów badawczych w tym jednego finansowanego przez NCN. Zaznaczam, że sformułowane w mojej recenzji uwagi i pytania nie obniżają wysokiej wartości zaprezentowanych wyników, lecz mają stanowić przyczynek do dyskusji naukowej.

Konkluzja końcowa

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Bojke przedstawia bardzo szeroko zakrojone i dobrze zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej wysoki poziom merytoryczny. Praca spełnia wymogi ustawowe i w związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Bojke dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.



Dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ