

Siedlce, 29.09.2024 r.

prof. dr hab. Cezary Tkaczuk
Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa
Wydział Nauk Rolniczych
Uniwersytet w Siedlcach
ul. B. Prusa 14, 08-110 Siedlce

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Wojciechowskiej
pt., **WPLYW ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN NA CHEMICZNY SKŁAD ZWIĄZKÓW
KUTYKULARNYCH I WEWNĘTRZNYCH WYBRANYCH GATUNKÓW OWADÓW"**

1. Wprowadzenie

Niniejsza ocena rozprawy doktorskiej została wykonana w odpowiedzi na pismo Pana dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego, prof. UG, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (z dnia 10.07.2024 roku) wraz z informacją, że uchwałą Rady Dyscypliny z dnia 3 lipca 2024 roku, wyznaczono mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Marty Wojciechowskiej. Niniejsze pismo otrzymałem drogą pocztową w dniu 08.08.2024 r.

Pracę doktorską wykonano w Katedrze Analizy Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Marka Gołębiowskiego, profesora uczelni.

2. Ocena podjętej problematyki badawczej

Ochrona roślin i produktów żywnościowych przed szkodliwymi owadami oraz kontrola chorób ludzi i zwierząt przenoszonych przez wektory owadzie, w dużej mierze opierają się na środkach owadobójczych, czyli insektycydach. Powszechne stosowanie chemicznych środków owadobójczych prowadzi do rozwoju odporności owadów na ich substancje czynne. Insektycydy eliminują podatne osobniki z populacji, pozostawiając formy odporne, a kolejne pokolenia dziedziczą cechy determinujące odporność, co prowadzi do znacznego obniżenia skuteczności stosowanych zabiegów ochrony roślin. Szczególnie niepokojące są przypadki, w których rozwinęła się odporność szkodników na wiele grup substancji czynnych środków owadobójczych. Na rynek wprowadzane są kolejno nowe insektycydy, co stwarza konieczność ciągłej oceny nie tylko ich skuteczności, ale również oddziaływania na środowisko naturalne oraz populacje stawonogów pożytecznych, których obecność w uprawach sprzyja bioróżnorodności i stwarza możliwość naturalnej regulacji liczebności fitofagów.

Podjęta przez Panią mgr Martę Wojciechowską w ocenianej rozprawie, szczegółowa analiza ilościowa i jakościowa pozwoliła na zidentyfikowanie szerokiej gamy związków chemicznych z

różnych grup, które są syntezowane lub zużywane przez owady po zastosowaniu insektycydów, co jest prawdopodobnie ich reakcją obronną. Związki syntezowane przez owady mogą pełnić różnorodne funkcje. Kwasy tłuszczowe, aldehydy i alkohole wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Acyloglicerole i kwasy tłuszczowe są źródłem energii, a mieszaniny alkoholi, kwasów tłuszczowych, węglowodorów, aldehydów i estrów chronią naskórek owadów przed wysychaniem jak również pełnią funkcje feromonów płciowych, kairomonów i allomonów. Wiedza jak owady reagują na zastosowane do ich zwalczania środki ochrony roślin, poszerza znajomość mechanizmów ich odporności i może przyczynić się do opracowania skutecznych i bezpiecznych metod zwalczania szkodliwych owadów, które jak wcześniej wspomniano, wyrządzają istotne straty w uprawach oraz w trakcie przechowywania produktów pochodzenia roślinnego.

3. Formalna analiza rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona w formie monografii i jest podzielona na 7 głównych części wyodrębnionych zgodnie z klasycznym schematem redagowania prac naukowych. Wyróżniono następujące główne rozdziały: 1. Wstęp; 2. Część literaturowa; 3. Cel pracy; 4. Część eksperymentalna; 5. Wyniki i dyskusja; 6. Wnioski. Rozprawa obejmuje ponadto profesjonalnie sporządzony wykaz piśmiennictwa oznaczony jako rozdział – Literatura. W dysertacji zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Przedłożona do recenzji praca Pani mgr Marty Wojciechowskiej jest bardzo obszerna i obejmuje łącznie 304 strony tekstu. Integralną część pracy stanowi 81 tabel i 213 rysunków zamieszczonych bezpośrednio w tekście, w których zestawiono i przedstawiono w sposób graficzny uzyskane wyniki. Poziom edytorski pracy ocenić należy jako bardzo staranny i nie budzący zastrzeżeń. Bazę bibliograficzną rozprawy stanowi w sumie 292 pozycji literaturowych, które zostały trafnie dobrane do tematu i celu pracy. Warto podkreślić, że ponad 95% pozycji to literatura anglojęzyczna.

4. Merytoryczna ocena pracy

Cele podjętych przez Doktorantkę badań zostały precyzyjnie i jasno sformułowane. Głównym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wybranych insektycydów na skład związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych trzech gatunków owadów: mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), stonki ziemniaczanej (*Leptinotarsa decemlineata*) i barciaka większego (*Galleria mellonella*).

Cele szczegółowe obejmowały: (i) wyznaczenie parametrów walidacyjnych metody oznaczania związków wytwarzanych przez owady, (ii) wytypowanie związków, które prawdopodobnie zostały zsyntezowane pod wpływem zastosowanych środków ochrony roślin lub były pobrane przez owady testowe wraz z pożywieniem i wykorzystywane w celu obrony przed niekorzystnym działaniem

insektycydów, (iii) określenie różnic w składzie związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych owadów kontrolnych i owadów, względem których zastosowano insektycydy z uwzględnieniem czasu jaki upłynął od ich użycia, stadiów rozwojowych owadów oraz rodzajem zastosowanych środków owadobójczych z wykorzystaniem testów statystycznych.

W rozdziale „Część literaturowa”, podzielonym na 6 głównych podrozdziałów, Autorka zebrała istniejące w literaturze światowej szczegółowe i aktualne informacje dotyczące: ogólnej charakterystyki owadów, ze szczególnym uwzględnieniem pokrycia ich ciała, budowy komórkowej i funkcji ciała tłuszczowego oraz mechanizmów odporności owadów, zwłaszcza w odniesieniu do środków ochrony roślin. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono charakterystykę wykorzystanych w pracy owadów testowych oraz badanych insektycydów z grupy pyretroidów, neonikotynoidów oraz bioinsektycydów opartych na bakterii *Bacillus thuringiensis*. Następnie Doktorantka przedstawiła krótki opis metod chromatograficznych wykorzystywanych do analizy związków chemicznych wchodzących w skład budowy ciała owadów, opis wybranych metod badawczych takich jak chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas oraz metoda mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) i ekstrakcji rozpuszczalnikowej. W ostatnim podrozdziale opisano szczegółowe zasady identyfikacji na podstawie widma mas wybranych związków organicznych z grupy: alkanów, alkenów, kwasów karboksylowych, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów karboksylowych i steroli.

Materiał i metody badań przyjęte w ocenianej rozprawie doktorskiej, opisane w rozdziale „Część eksperymentalna” nie budzą zastrzeżeń, są prawidłowo i bardzo starannie dobrane do realizacji poszczególnych zadań badawczych. Na wysoką ocenę zasługują zastosowane w pracy metody statystyczne, które pozwoliły na dokładną analizę uzyskanych wyników i określenie różnic w składzie związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych owadów kontrolnych i owadów, wobec których zastosowano insektycydy z uwzględnieniem: różnych stadiów rozwojowych owadów (osobniki dorosłe obu płci i larwy), czasu jaki upłynął od użycia insektycydów oraz rodzaju zastosowanych środków owadobójczych.

Do badań wybrano trzy gatunki owadów szkodliwych, dwa gatunki chrząszczy - mącznik młynarek i stonka ziemniaczana oraz jeden gatunek reprezentujący rząd motyli - barciak większy. Insektycydy zastosowano w formie oprysku w zalecanych stężeniach handlowych. W przypadku *T. molitor* były to dwa preparaty z grupy pyretroidów - Cyflok 50EW (cyflutryna) oraz K-othrine 25WG (deltametryna). W stosunku do osobników dorosłych i larw stonki ziemniaczanej zastosowano dwa insektycydy z grupy neonikotynoidów: Actara 25WG (tiametoksam) oraz Mospilan 20SP (acetamipryd), a przeciw barciakowi większemu wykonano zabieg za pomocą bioinsektycydu zawierającego przetrwalniki bakterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Analizy związków chemicznych obecnych w ciele owadów dokonywano po 24, 48 i 72 godzinach od potraktowania

osobników testowych insektycydem w formie oprysku roztworem wodnym w odpowiednio dobranym stężeniu.

W zależności od lotności związków zawartych w owadach, próbki do analiz zostały przygotowane różnymi metodami. Związki wewnętrzne, wytwarzane w ciele tłuszczowym owadów przed i po zastosowaniu insektycydów, były ekstrahowane z wykorzystaniem metody Folcha, związki kutykularne metodą ekstrakcji rozpuszczalnikowej, a związki lotne metodą mikroekstrakcji do fazy stałej (HS-SPME). Analizy jakościowe i ilościowe wyekstrahowanych z owadów związków zostały wykonane z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Wykorzystanie tak bogatej gamy metodyk badawczych i umiejętne łączenie informacji uzyskanych komplementarnymi metodami, w mojej opinii, dobrze świadczy o umiejętnościach eksperymentalnych Doktorantki (zwłaszcza w zakresie planowania i przebiegu doświadczeń) jak i szerokiej wiedzy teoretycznej o stosowanych technikach badawczych.

Integralną częścią rozprawy doktorskiej jest rozdział „Wyniki i dyskusja”, który został podzielony na sześć podrozdziałów, gdzie Pani mgr Marta Wojciechowska zestawiała uzyskane przez siebie wyniki wraz z ich interpretacją.

Należy podkreślić, że przed przystąpieniem do analiz związków chemicznych zawartych w ciele owadów testowych, Doktorantka przeprowadziła szczegółowe badania nad wyznaczeniem parametrów walidacyjnych, co pozwoliło określić jak doskonała i wiarygodna jest metoda, którą wybrano do analiz związków zawartych w próbkach. Wyznaczono z wykorzystaniem metody GC-MS, następujące parametry walidacyjne: granicę oznaczalności (LOD), granicę wykrywalności (LOQ), liniowość metody, precyzję, powtarzalność i dokładność. Wyniki uzyskane dla wyznaczonych parametrów walidacyjnych pozwoliły stwierdzić, że wybrane metody analityczne mogą być zastosowane do oznaczeń kwasów tłuszczowych, aldehydów, alkanów, alkoholi i estrów oraz innych związków zawartych w próbkach naturalnych.

Uzyskane w wyniku badań analitycznych wyniki zostały przez Doktorantkę pogrupowane w sekwencji wpływu insektycydów na zawartość związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych zawartych w owadach trzech badanych gatunków (z podziałem na samice i samce oraz stadia larwalne) zarówno przed (owady kontrolne), jak i po zastosowaniu insektycydów.

Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę jakościową i ilościową szerokiej gamy związków (kwasy tłuszczowe, alkany, alkeny, alkohole, sterole, aldehydy, estry, acyloglicerole, ketony, terpeny i in.), która pozwoliła na określenie profili wewnętrznych, kutykularnych i lotnych związków chemicznych zawartych w owadach kontrolnych i owadach poddanych działaniu insektycydów, a ponadto na wytypowanie związków z powyższych trzech grup, które prawdopodobnie

zostały wykorzystane przez badane owady w celu obrony przed niekorzystnym działaniem zastosowanych do ich zwalczania insektycydów.

Autorka sformułowała siedem głównych wniosków, które wynikają logicznie z przeprowadzonych badań i potwierdzają osiągnięcie założonych celów. W mojej opinii treść poszczególnych wniosków powinna mieć jednak bardziej syntetyczny charakter.

Do najważniejszych osiągnięć poznawczych przedstawionych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Marty Wojciechowskiej zaliczam:

- Wyznaczenie parametrów walidacyjnych metody oznaczania związków chemicznych wytwarzanych przez owady
- Wykazanie, że skład jakościowy i ilościowy związków wytwarzanych przez owady wykazuje różnice w zależności od gatunku, płci i stadium rozwojowego owada
- Udowodnienie, że istnieją różnice (często istotne statystycznie) w składzie związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych wytwarzanych przez owady kontrolne i owady, względem których zastosowano insektycydy
- Wykazanie, że rodzaj użytego środka owadobójczego oraz czas narażenia owadów na jego działanie - ma wpływ na skład wytwarzanych przez nie związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych
- Wytypowanie związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych w trzech gatunkach szkodliwych owadów, które prawdopodobnie zostały zsyntezowane pod wpływem insektycydów lub były pobrane wraz z pożywieniem. Były to związki obecne tylko w owadach, względem których zastosowano insektycydy
- Wytypowanie związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych w trzech badanych gatunkach owadów, które prawdopodobnie zostały wykorzystane w celu obrony przed niekorzystnym działaniem zastosowanych do ich zwalczania insektycydów. Były to związki, które były obecne tylko w owadach kontrolnych, a nie było ich w owadach, względem których zastosowano insektycydy

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Wojciechowskiej została starannie przygotowana, a analiza jej treści, pomimo bardzo dużej ilości uzyskanych wyników i obszerności pracy (w sumie 304 strony tekstu) nie nastęrcza większych trudności. Na wysoką ocenę zasługuje fakt, że rozprawa zawiera bardzo liczne, przejrzyste i starannie przygotowane ilustracje (213 rysunków), co jest niewątpliwie dużą zasługą Autorki i znacznie ułatwia lekturę całego opracowania.

Pozytywnie należy ocenić również dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki, na który składa się sześć publikacji naukowych, w tym 5 związanych z tematem rozprawy doktorskiej oraz

współautorstwo trzech doniesień zaprezentowanych na konferencjach naukowych. Pani mgr Marta Wojciechowska była kierownikiem czterech projektów naukowych realizowanych w ramach projektów Badawczych Młodych Naukowców, finansowanych z dotacji celowej MNiSW.

5. Uwagi szczegółowe

- 1) We Wstępie Doktorantka nieprawidłowo zaliczyła do metod fizycznych ochrony roślin - stosowanie do zwalczania szkodliwych owadów „...pułapek, hermetycznych magazynów oraz różnego rodzaju barier...”, gdyż są to raczej mechaniczne, a nie fizyczne metody ochrony roślin.
- 2) W rozdziale część eksperymentalna Autorka nadmienia, że „ w celu wyeliminowania śmierci owadów z głodu, hodowano je przez kilka tygodni z dostępem do żywności”, brakuje jednak informacji jaki pokarm podawano owadom testowym (imago i larwom) przed zastosowaniem oprysku insektycydami ? Celowe byłoby również uzupełnienie informacji na temat warunków świetlnych w jakich hodowano owady.
- 3) W metodyce brakuje informacji w jakich stadiach larwalnych były owady w momencie wykonywania oprysku insektycydami, a wiadomo, że poszczególne stadia larwalne różnią się wrażliwością na substancje czynne środków owadobójczych.
- 4) Proszę Doktorantkę o odpowiedź, jakie było uzasadnienie wykonania opryskiwania bioinsektycydem B401, zawierającym przetrwalniki bakterii *Bacillus thuringiensis*, w odniesieniu do osobników dorosłych (motyli) barciaka większego, skoro toksyny tej bakterii wykazują działanie owadobójcze wyłącznie w stosunku do larw motyli, po ich pobraniu drogą pokarmową i rozpuszczeniu się w ich przewodzie pokarmowym?
- 5) Doktorantka, mówiąc o zastosowanych w badaniach insektycydach często posługuje się w tekście pracy terminami „pestycydy” czy „środki ochrony roślin”. Należy jednak pamiętać, że oba te określenia mają znacznie szersze znaczenie niż insektycydy (czyli środki owadobójcze) i odnoszą się również m.in. do fungicydów czy herbicydów, które służą do zwalczania odpowiednio grzybowych patogenów i chwastów w uprawach roślin.

Powyższe uwagi mają charakter wyłącznie dyskusyjny i nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej dysertacji.

6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Wojciechowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Dysertacja ta jest jednym z

nielicznych opracowań, w którym w tak szerokim zakresie i w sposób kompleksowy zbadano wpływ insektycydów na skład związków wewnętrznych, kutykularnych i lotnych owadów.

Pani mgr Marta Wojciechowska wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną oraz przeprowadziła w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej szereg prawidłowo zaplanowanych i poprawnie metodycznie wykonanych eksperymentów. Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w zakresie analizy i dyskusji uzyskanych wyników, a tym samym w dobrym stopniu opanowała warsztat pracy naukowej, niezbędny do prowadzenia badań na wysokim poziomie. Należy wyraźnie podkreślić, że Pani mgr Marta Wojciechowska przedstawiła w swojej rozprawie doktorskiej wiele nowych i oryginalnych wyników badań w dyscyplinie nauk chemicznych, które pozwoliły na sformułowanie wartościowych wniosków.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr Martę Wojciechowską praca spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego, wniosek o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Cezary Tkaczuk