



## **AUTOREFERAT**

**Omówienie cyklu publikacji pt.**

**Analityka kutykularnej i wewnętrznej frakcji lipidowej  
wybranych gatunków owadów w poszukiwaniu związków  
aktywnych biologicznie**

**Marek Gołębiowski**

**Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański**

**Gdańsk, 2015**

## 1. Imię i nazwisko: Marek Gołębiowski

## 2. Posiadane stopnie i tytuły naukowe

### Stopień doktora

Stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (28.06.2002)

Rozprawa doktorska pt. „**Ekologia chemiczna wybranych gatunków owadów**” wykonana pod kierunkiem dra hab. inż. Edmunda Malińskiego, prof. UG.

### Tytuł zawodowy magistra

Tytuł zawodowy magistra Ochrony Środowiska, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Praca magisterska pt. „Sonda do pobierania gazów z osadów dennych; zaprojektowanie jej oraz praktyczne wykorzystanie” wykonana pod kierunkiem dra hab. inż. Edmunda Malińskiego, prof. UG.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2014 -	Kierownik Pracowni Analizy Związków Naturalnych, Wydział Chemii UG
2008 -	Adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
2007 - 2008	Asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
2003 - 2007	Specjalista, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
1999 - 2003	Młodszy specjalista, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

## 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

- a. **Tytuł rozprawy habilitacyjnej: Analytyka kutykularnej i wewnętrznej frakcji lipidowej wybranych gatunków owadów w poszukiwaniu związków aktywnych biologicznie**
- b. **Cykl prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, stanowiących osiągnięcie naukowe**

- H1. Marek Gołębiowski\***, Mieczysława I. Boguś, Monika Paszkiewicz, Piotr Stepnowski, (2010) The composition of the free fatty acids from *Dendrolimus pini* exuviae. *Journal of Insect Physiology* 56, 391–397. **IF<sub>2010</sub>=2,310**
- H2. Marek Gołębiowski\***, Mieczysława I. Boguś, Monika Paszkiewicz, Piotr Stepnowski, (2011) Cuticular lipids of insects as a potential biofungicides: methods of lipids composition analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 3177-3191. **IF<sub>2011</sub>=3,778**
- H3. Marek Gołębiowski\***, Mieczysława I. Boguś, Monika Paszkiewicz, Wioletta Wieloch, Emilia Włóka, Piotr Stepnowski, (2012) The composition of the cuticular and internal free fatty acids and alcohols from *Lucilia sericata* males and females. *Lipids* 47, 613–622. **IF<sub>2012</sub>=2,557**
- H4. Marek Gołębiowski\***, Monika Paszkiewicz, Anna Grubba, Dagmara Gąsiewska, Mieczysława I. Boguś, Emilia Włóka, Wioletta Wieloch, Piotr Stepnowski, (2012) Cuticular and internal n-alkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines; application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM. *Bulletin of Entomological Research* 102, 453-460. **IF<sub>2012</sub>=1,987**
- H5. Marek Gołębiowski\***, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Mieczysława I. Boguś, Wioletta Wieloch, Emilia Włóka, Monika Paszkiewicz, Elżbieta Przybysz, Piotr Stepnowski, (2012) The antimicrobial activity of the alcohols from *Musca domestica*. *Journal of Experimental Biology* 215, 3419-3428. **IF<sub>2012</sub>=3,236**
- H6. Aleksandra Urbanek\***, Ryszard Szadziewski, Piotr Stepnowski, Joanna Boros-Majewska, Iwona Gabriel, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Danuta Sosnowska, **Marek Gołębiowski\***, (2012) Composition and antimicrobial activity of fatty acids detected in the hygroscopic secretion collected from the secretory setae of larvae of the biting midge *Forcipomyia nigra* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Insect Physiology* 58, 1265–1276. **IF<sub>2012</sub>=2,379**
- H7. Marek Gołębiowski\***, (2012) Comparison of free fatty acids composition of cuticular lipids of *Calliphora vicina* larvae and pupae. *Lipids* 47, 1001-1009. **IF<sub>2012</sub>=2,557**
- H8. Marek Gołębiowski\***, Magdalena Cerkowniak, Mieczysława I. Boguś, Emilia Włóka, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Piotr Stepnowski, (2013) Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. *Journal of Insect Physiology* 59, 416–429. **IF<sub>2013</sub>=2,500**
- H9. Marek Gołębiowski\***, Magdalena Cerkowniak, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Mieczysława I. Boguś, Piotr Stepnowski, (2013) The antifungal activity of the cuticular and internal fatty acid methyl esters and alcohols in *Calliphora vomitoria*. *Parasitology* 140, 972–985. **IF<sub>2013</sub>=2,350**

- H10. Marek Gołębiowski\***, Magdalena Cerkowniak, Mieczysława I. Boguś, Emilia Włóka, Elżbieta Przybysz, Piotr Stepnowski, (2013) Developmental changes in the composition of sterols and glycerol in the cuticular and internal lipids of three species of fly. *Chemistry and Biodiversity* 10, 1521–1530. **IF<sub>2013</sub>=1,795**
- H11. Marek Gołębiowski\***, Aleksandra Urbanek, Alma Oleszczak, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Mieczysława I. Boguś, Piotr Stepnowski, (2014) The antifungal activity of free fatty acids of all stages of *Sarcophaga carnaria* L. (Diptera: Sarcophagidae). *Microbiological Research* 169, 279–286. **IF<sub>2013</sub>=1,939**
- H12.** Magdalena Cerkowniak, Alan Puckowski, Piotr Stepnowski, **Marek Gołębiowski\***, (2013) The use of chromatographic techniques for the separation and the identification of insect lipids. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 937, 67–78. **IF<sub>2013</sub>=2,694**
- H13. Marek Gołębiowski\***, Magdalena Cerkowniak, Aleksandra Urbanek, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Mieczysława I. Boguś, Danuta Sosnowska, Piotr Stepnowski, (2014) Antimicrobial activity of untypical lipid compounds in the cuticular and internal lipids of four fly species. *Journal of Applied Microbiology* 116, 269-287. **IF<sub>2013</sub>=2,386**
- H14. Marek Gołębiowski\***, Anita Sosnowska, Tomasz Puzyn, Mieczysława I. Boguś, Wioletta Wieloch, Emilia Włóka, Piotr Stepnowski, (2014) Application Two-Ways Hierarchic Cluster Analysis for identification similarities between the individual lipid fractions of *Lucilia sericata*. *Chemistry & Biodiversity* 11, 733-748. **IF<sub>2013</sub>=1,795**
- H15. Marek Gołębiowski\***, Magdalena Cerkowniak, Aleksandra Urbanek, Małgorzata Słocinska, Grzegorz Rosiński, Piotr Stepnowski, (2014) Effect of adipokinetic hormone on changes of lipids in the fat body of *Zophobas atratus*. *Peptides* 58, 65-73. **IF<sub>2013</sub>=2,614**
- H16. Marek Gołębiowski\***, Magdalena Cerkowniak, Aleksandra Urbanek, Małgorzata Dawgul, Wojciech Kamysz, Mieczysława I. Boguś, Piotr Stepnowski, (2015) Identification and antifungal activity of the novel organic compounds found in cuticular and internal lipids of medically important flies. *Microbiological Research*, 170, 213–222. **IF<sub>2013</sub>=1,939**  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.06.004>)

**\* Autor korespondencyjny**

Publikacje H3 – H5, H7 – H11 oraz H13, H14 i H16 powstały w wyniku realizacji grantu MNiSW NN303 504238 (2010–2013) *Analiza składu lipidów powierzchniowych larw, poczwerek i dorosłych*

owadów wybranych gatunków much oraz karaczanów pod kątem poszukiwania substancji przeciwgrzybowych, w którym pełniłem funkcję kierownika.

Publikacje H1, H6 i H15 są efektem kontynuacji tej tematyki.

Publikacje H2 i H12 są pracami przeglądowymi dotyczącymi osiągnięcia naukowego.

We wszystkich szesnastu publikacjach jestem autorem korespondencyjnym.

### **c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

## **Analityka kutykularnej i wewnętrznej frakcji lipidowej wybranych gatunków owadów w poszukiwaniu związków aktywnych biologicznie**

### **Wstęp**

Zdolność adaptacji owadów do życia w niemal każdych warunkach środowiskowych sprawiła, iż zaliczają się one do najliczniejszej grupy świata zwierzęcego. Obecność owadów w środowisku życia człowieka przejawia się cechami zarówno pozytywnymi, jak i negatywnymi. Owady m. in. zapylają rośliny, oczyszczają ziemię z martwych, butwiejących resztek organicznych czy poprawiają strukturę gleby. Odpowiadają również za niszczenie lasów, upraw i produktów spożywczych oraz są wektorami groźnych chorób ludzi i zwierząt.

Na powierzchni kutykuli owadów znajduje się wiele związków organicznych, których główną funkcją jest zapobieganie przed utratą wody [1, 2], a także ochrona przed infekcją, którą mogą wywoływać mikroorganizmy [3, 4]. Ułatwiają one także chemiczną komunikację pomiędzy owadami [5, 6], a ich skład jest źródłem wielu ciekawych informacji i niejednokrotnie był wykorzystywany w chemotaksonomii owadów [4, 7]. Umownie, związki te nazywa się niezbyt ściśle „lipidami” choć oprócz samych lipidów znajduje się tam wiele innych grup związków chemicznych, w tym węglowodory, alkohole, aldehydy, ketony i inne. Podobnie jak lipidy kutykularne, tak i tzw. lipidy wewnętrzne owadów pod względem chemicznym są związkami należącymi do różnych klas. Stąd też w niniejszym opracowaniu stosowana będzie ta entomologiczna terminologia opisująca frakcje tych związków chemicznych mając wszakże na uwadze jej daleko idącą, systematyczną nieścisłość.

Analityka chemiczna związków pobieranych z pożywieniem lub wytwarzanych przez owady jest bardzo ważnym aspektem, który może być wykorzystany do opracowywania biologicznych metod walki ze szkodliwymi owadami. Informacje uzyskane w trakcie tych analiz mogą być także wykorzystywane do poszukiwania związków organicznych, które wykazują aktywność biologiczną,

przede wszystkim przeciwgrzybiczą lub przeciwbakteryjną. Z reguły pierwszym etapem procesu analitycznego frakcji lipidowych owadów jest analiza grupowa, która wykorzystuje następujące techniki: chromatografię cieczową kolumnową (LC), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) i preparatywną chromatografię cienkowarstwową (TLC) [8-12]. Następnie, uzyskane w ten sposób poszczególne frakcje związków analizowane są technikami GC i GC/MS [13-15]. W celu analizy lotnych związków organicznych można zastosować technikę SPME-GC/MS, natomiast frakcję nielotną zwykle analizuje się techniką MALDI lub LC/MS [16-19].

Owady wytworzyły specyficzne mechanizmy obronne przeciwko ich naturalnym wrogom. Z kolei mikroorganizmy atakujące owady posiadają wiele tzw. czynników wirulentnych, pozwalających na opanowanie organizmu owada. Poznanie tych zależności ma duże znaczenie w opracowaniu biologicznych metod zwalczania owadów, które są szkodnikami upraw. Badania te głównie skupiają się na poznaniu potencjału naturalnych wrogów owadów, tj. grzybów, bakterii, wirusów i nicieni. Do arsenału środków praktycznie stosowanych w ograniczaniu liczebności populacji szkodników upraw wprowadzone zostały grzyby i bakterie owadobójcze. Grzyby atakujące owady pochodzą z różnych grup taksonomicznych i mają bardzo szeroki zasięg działania. W związku z tym warto zwrócić uwagę na to w jaki sposób porażają swoje ofiary. Ważne jest również, aby poznać bariery obronne wykształcone przez owady oraz zmiany wywołane w ich organizmach przez infekcję grzybiczą. Dysponując takimi informacjami można ustalić warunki, które pomogłyby wykorzystać grzyby jako bioinsektycydy. Z drugiej strony można także wykorzystać zidentyfikowane związki pochodzenia owadziego w medycynie jako środki przeciwgrzybicze lub przeciwbakteryjne. Prace zestawione w niniejszym osiągnięciu habilitacyjnym wpisują się w trend tego typu badań, pogłębiając wiedzę na temat chemii i biochemii owadów, ich naturalnych wrogów oraz mechanizmów ich wzajemnego oddziaływania. Intencją autora cyklu było znalezienie choć części odpowiedzi na nurtujące nas współcześnie pytania zarówno z dziedziny patologii owadów, jak i praktycznego wykorzystania ich charakterystyki chemicznej.

## 1. Opis osiągnięcia naukowego

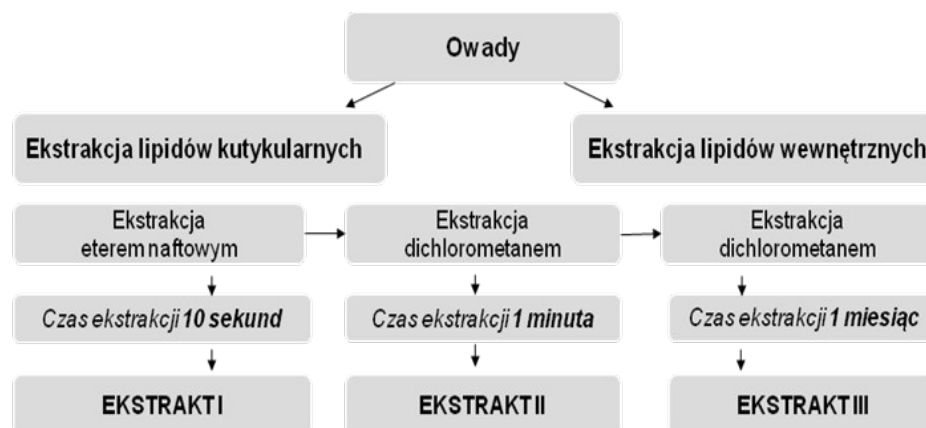
W skład cyklu habilitacyjnego wchodzi 14 oryginalnych publikacji naukowych oraz dwie prace przeglądowe. Dotyczą one analityki kutykularnych i wewnętrznych frakcji lipidowych 8 gatunków owadów oraz aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej zarówno całych frakcji, jak i wybranych, zidentyfikowanych związków. Analizie poddane były dorosłe osobniki z podziałem na samce i samice, a także larwy, poczwarki oraz wylinki owadów. Obiektem badań było 5 gatunków padlinożernych muchówek (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata*, *Sarcophaga carnaria*, *Musca domestica*), wylinki *Dendrolimus pini*, wydzielina

*Forcipomyia nigra* i ciało tłuszczowe larw i poczwerek *Zophobas atratus*. Wszystkie muchówki i larwy *D. pini* zostały wyhodowane i zidentyfikowane w Instytucie Parazytologii PAN w Warszawie, natomiast larwy *F. nigra* otrzymano z Katedry Zoologii Bezkręgowców i Parazytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, a *Z. atratus* otrzymano z Zakładu Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Prace przeglądowe dotyczyły metod analizy związków organicznych biosyntezyowanych przez owady.

W celu identyfikacji i analiz ilościowych związków obecnych na powierzchni i wewnątrz owadów wykonano ekstrakcję rozpuszczalnikową. Otrzymane w ten sposób ekstrakty były rozdzielane na grupy związków metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z laserowym detektorem fotodispersyjnym (HPLC-LLSD). Należy przy tym zaznaczyć, iż zastosowanie tego typu detektora do analizy grupowej frakcji lipidowych owadów było rozwiązaniem pionierskim w przypadku tego typu analitów. Analizy jakościowe i ilościowe frakcji lipidowych były przeprowadzone z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC) oraz chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC/MS). Część związków była identyfikowana w postaci natywnej (np. węglowodory i estry metylowe kwasów tłuszczowych), a niektóre grupy związków w postaci odpowiednich pochodnych (np. kwasy tłuszczowe i alkohole). W wyniku analiz GC i GC/MS wyekstrahowanych frakcji lipidowych stwierdzono obecność różnorodnych związków chemicznych. Aby stwierdzić, które z nich chronią owady przed infekcjami grzybiczymi i bakteryjnymi dokonano analizy wpływu związków owadzych na wzrost bakterii i grzybów. Warto przy tym dodać, iż wszystkie rezultaty analiz przedstawione w cyklu, zarówno co do badanych gatunków, jak i identyfikowanych związków, mają charakter wybitnie pionierski i póki co są jedynymi tego typu wynikami w literaturze światowej.

## **2. Przygotowanie próbek do analiz**

Ze względu na to, że frakcje lipidowe owadów charakteryzują się dużą różnorodnością chemiczną występujących tam związków, a co za tym idzie dużą rozpiętością ich polarności, we wszystkich badaniach przedstawionych w cyklu habilitacyjnym zastosowano ekstrakcję sekwencyjną z użyciem eteru naftowego i dichlorometanu. Typowa procedura ekstrakcji zapewniająca wstępne rozdzielenie grup związków została przedstawiona na rysunku 1. Krótkie ekstrakcje eterem naftowym, a następnie dichlorometanem pozwalają na wyodrębnienie związków kutykularnych, natomiast w wyniku długiej ekstrakcji dichlorometanem wydzielono związki wewnętrzne owadów.

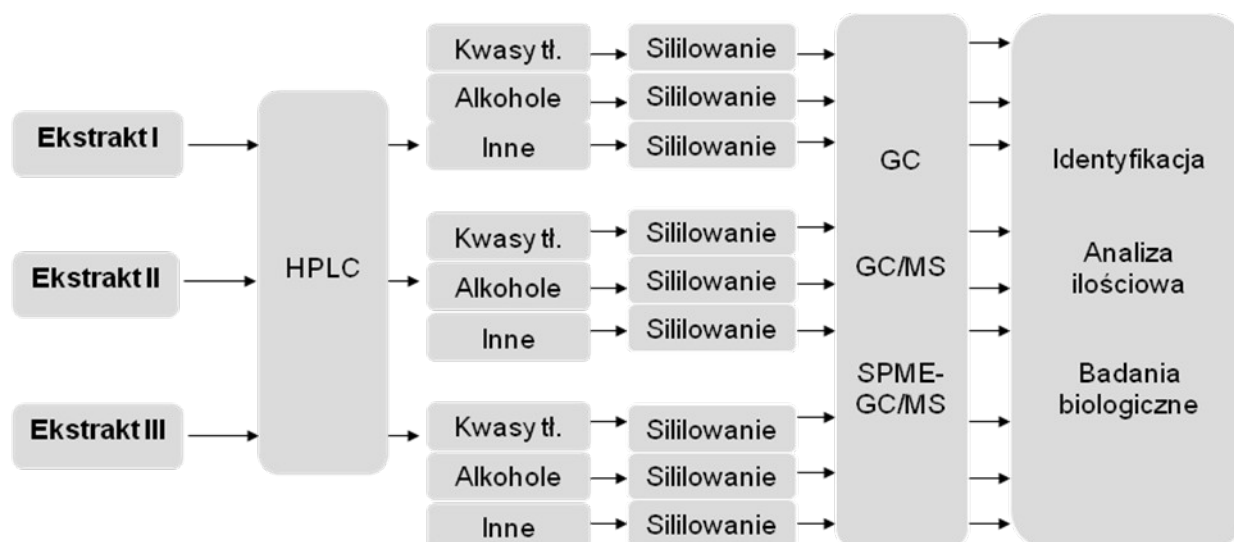


**Rys. 1.** Schemat ekstrakcji frakcji lipidowych owadów

Podczas ekstrakcji frakcji lipidowych z wylinek *D. pini*, z całych owadów *F. nigra* i z ciała tłuszczowego *Z. atratus*, ze względu na inny charakter matrycy, zastosowano inny sposób ekstrakcji niż w przypadku kutykularnych i wewnętrznych frakcji lipidowych pozostałych owadów. Ekstrakcja wylinek *D. pini* [H1] polegała na zastosowaniu tylko dwóch rozpuszczalników (eteru naftowego i dichlorometanu), ponieważ w tym przypadku nie były ekstrahowane wewnętrzne frakcje lipidowe. Ze względu na małe rozmiary owadów *F. nigra* [H6] przeprowadzono ekstrakcję całych owadów wyłącznie dichlorometanem. Do ekstrakcji ciała tłuszczowego *Z. atratus* [H15] również zastosowano ten rozpuszczalnik, ponieważ w przypadku tego owada nie były analizowane kutykularne frakcje lipidowe.

Otrzymane ekstrakty były z reguły rozdzielane na poszczególne grupy związków. Do tego celu zastosowano HPLC z aerozolowym detektorem promieniowania rozproszonego (LLSD). Rozdzielenia wykonywane były za pomocą analitycznej kolumny Econosil Silica 5  $\mu\text{m}$  ( $\phi=4,6$  mm i  $l=250$  mm). Jako fazę ruchomą stosowano eter naftowy (rozpuszczalnik A) i dichlorometan z dodatkiem 15% acetonu (rozpuszczalnik B). Zastosowano liniową zmianę składu fazy ruchomej od składu A do B w ciągu 30 minut. Otrzymane w ten sposób poszczególne grupy związków były przeprowadzane w pochodne trimetylosililowe i analizowane techniką GC/MS. Analiza frakcji lipidowych owadów polegała na identyfikacji oraz określaniu ilościowym poszczególnych związków. Schemat analizy tych frakcji przedstawiono na rysunku 2.

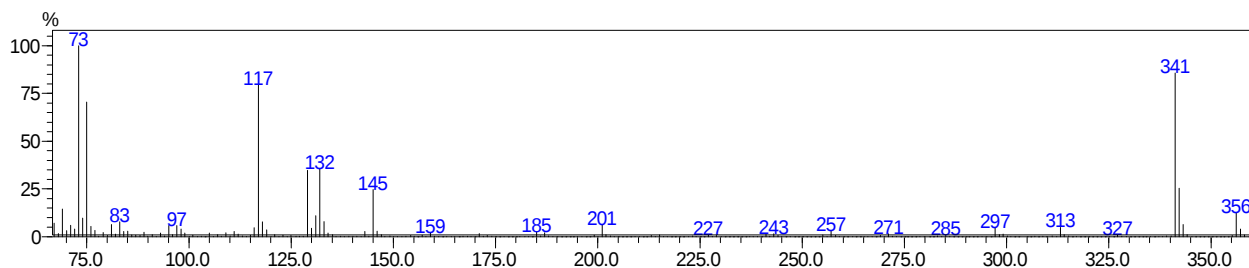




Rys. 2. Procedura analizy frakcji lipidowych owadów

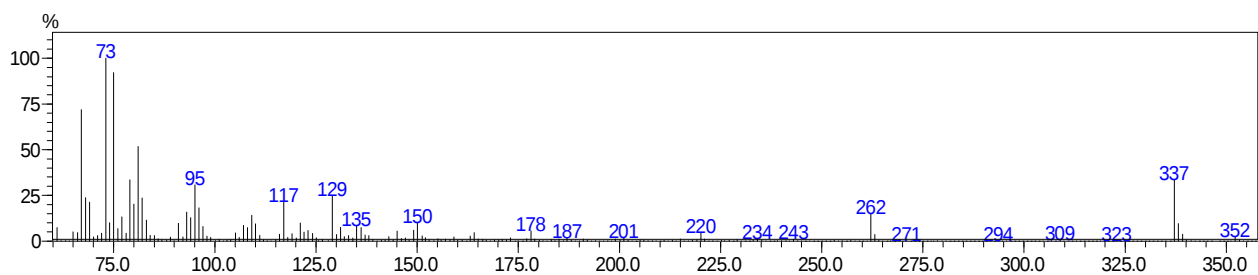
### 3. Identyfikacja związków chemicznych we frakcjach lipidów owadów

Identyfikację związków we frakcjach lipidowych owadów dokonano na podstawie czasów retencji, charakterystycznych widm mas oraz poprzez porównanie otrzymanych widm mas z widmami w bibliotece widm. Dodatkowo, podczas identyfikacji nietypowych dla owadów związków wykonano koiniekcję frakcji lipidowych z odpowiednimi wzorcami. W analizowanych gatunkach owadów zidentyfikowano następujące grupy związków: kwasy tłuszczowe, alkohole, n-alkany, estry, sterole oraz nietypowe dla owadów związki organiczne należące do różnych grup. Nasycone kwasy tłuszczowe były identyfikowane na podstawie charakterystycznych jonów pochodzących od pochodnych trimetylosililowych o  $m/z$  73, 117, 129, 132, 145,  $[M-15]^+$  i  $[M]^+$  (Rys. 3). Do analizy kwasów tłuszczowych w lipidach *L. sericata* zastosowano skanowanie w całym zakresie mas - TIC (Total Ion Current), jak również tryb SIM (Selected Ion Monitoring) [H3]. Technika ta jest szczególnie przydatna do identyfikacji związków występujących w szeregu homologicznym. Mogą być w ten sposób analizowane poszczególne jony molekularne lub charakterystyczne jony fragmentacyjne, np. kwasów tłuszczowych.



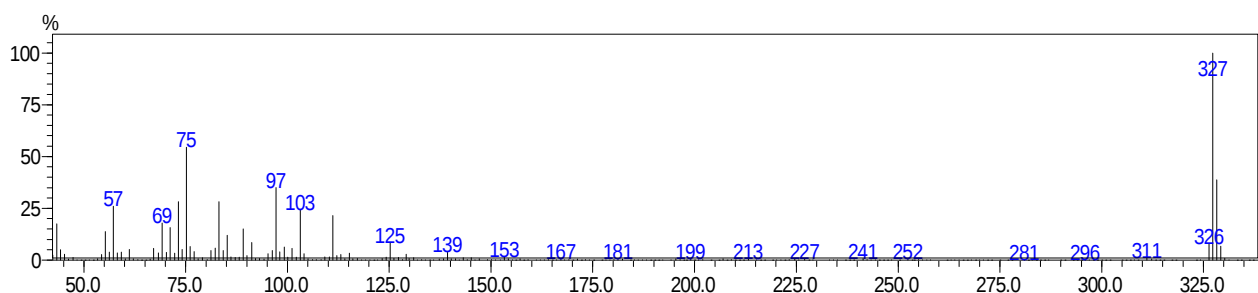
Rys. 3. Widmo mas kwasu oktadekanowego (pochodna trimetylosililowa - TMS)

Jeżeli w kwasach tłuszczowych obecne są miejsca nienasycenia, widma mas stają się mniej charakterystyczne, zwłaszcza gdy w danym związku obecnych jest kilka miejsc nienasycenia (Rys. 4).



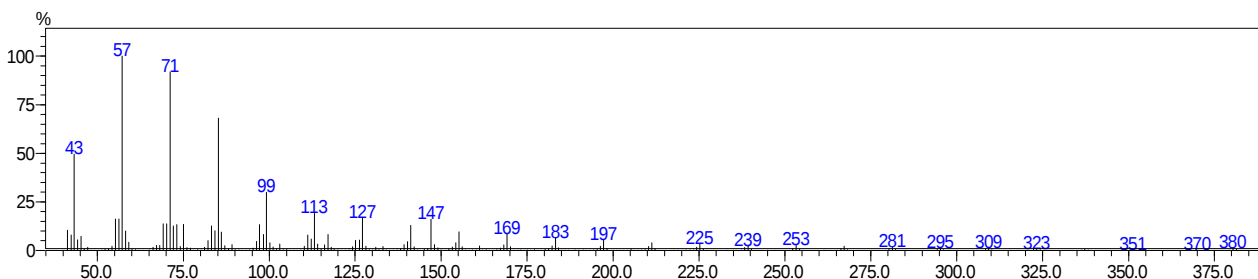
**Rys. 4.** Widmo mas kwasu oktadekadienowego (C18:2) (pochodna trimetylosililowa - TMS)

Alkohole były identyfikowane na podstawie charakterystycznych widm mas trimetylosililowych pochodnych zawierających jony o  $m/z$  73, 103 i  $[M-15]^+$  (Rys. 5).



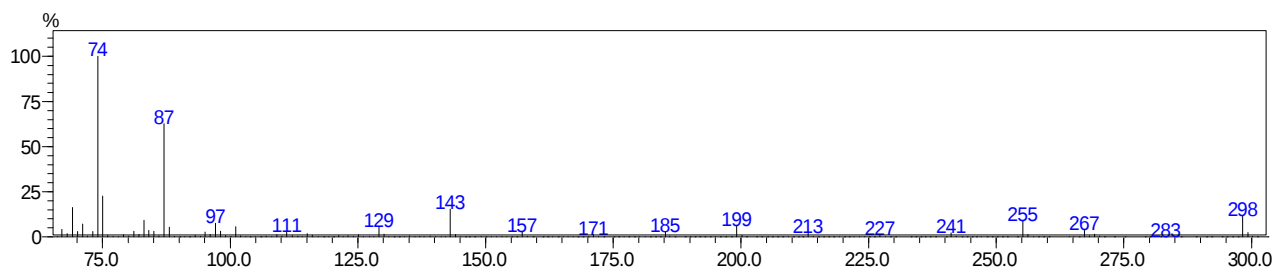
**Rys. 5.** Widmo mas oktadekanolu (pochodna trimetylosililowa - TMS)

Na widmach mas n-alkanów obecne są jony o  $m/z$  57, 71, 85, 99 oraz  $[M]^+$  (Rys. 6). Podobnie jak w analizie kwasów tłuszczowych *L. sericata*, do analizy n-alkanów tego gatunku owada zastosowano tryb TIC, jak również SIM [H4].

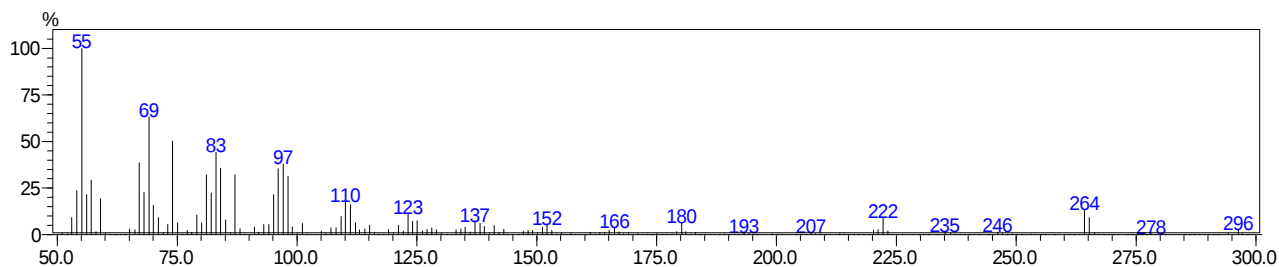


**Rys. 6.** Widmo mas heptakozanu

Estry metylowe kwasów tłuszczowych były identyfikowane na podstawie jonów o  $m/z$  74, 87 oraz  $[M]^+$  (Rys. 7). Widma mas nienasyconych estrów metylowych, podobnie jak nienasyconych kwasów karboksylowych są mniej charakterystyczne, przez co ich identyfikacja jest utrudniona (Rys. 8).

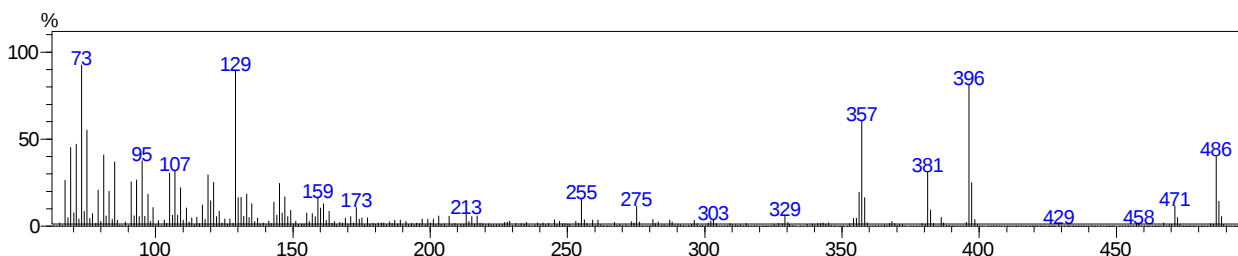


**Rys. 7.** Widmo mas estru metylowego kwasu oktadekanowego



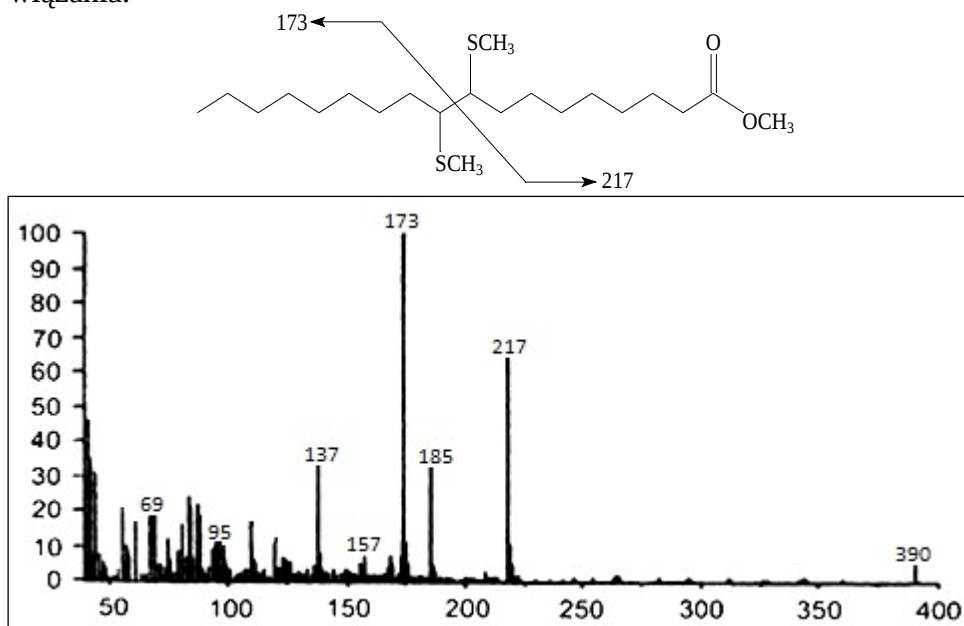
Rys. 8. Widmo mas estru metylowego kwasu oktadekenowego

Sterole były identyfikowane na podstawie charakterystycznych jonów trimetylosililowych pochodnych. Przykładowe widmo mas  $\beta$ -sitosterolu przedstawione jest na rysunku 9. Dzięki temu, że sterole posiadają różne masy cząsteczkowe i różne czasy retencji identyfikacja tych związków jest jednoznaczna.



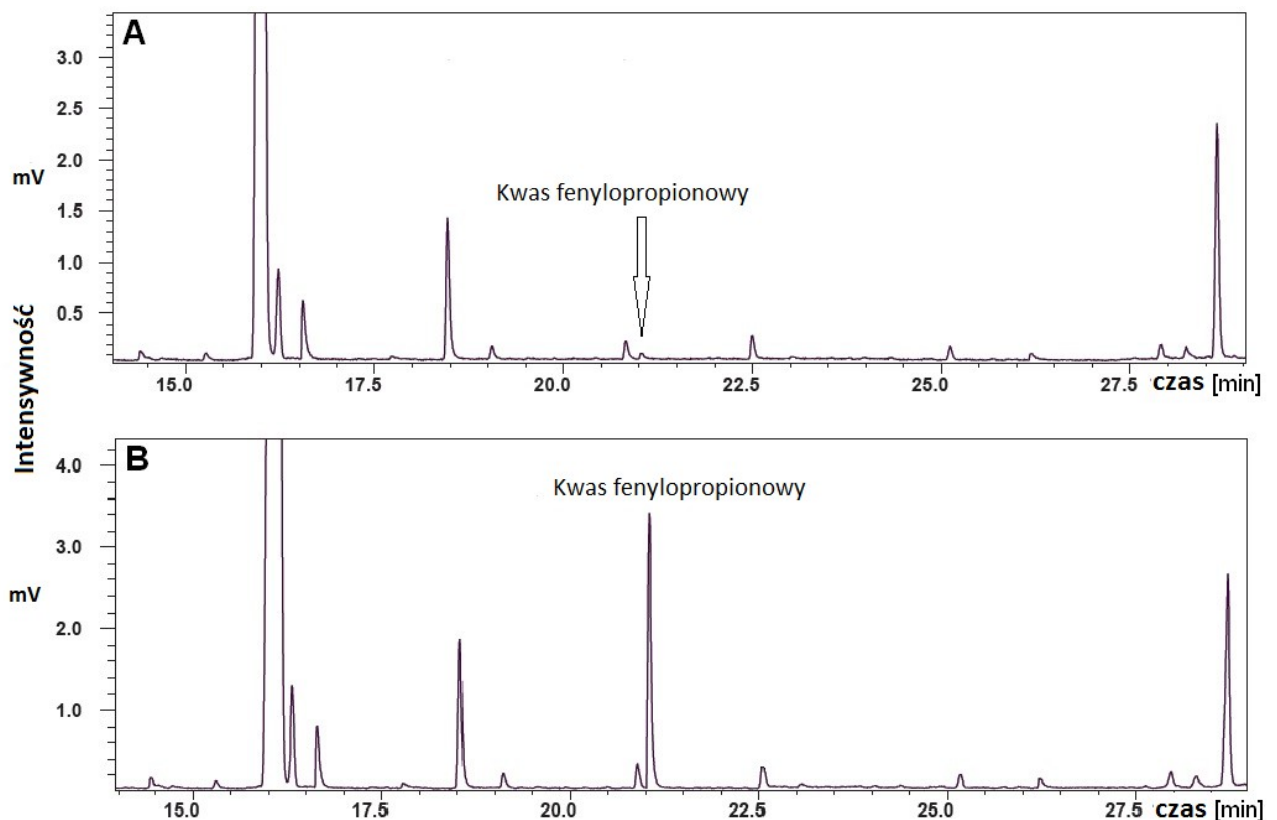
Rys. 9. Widmo mas  $\beta$ -sitosterolu (pochodna trimetylosililowa - TMS)

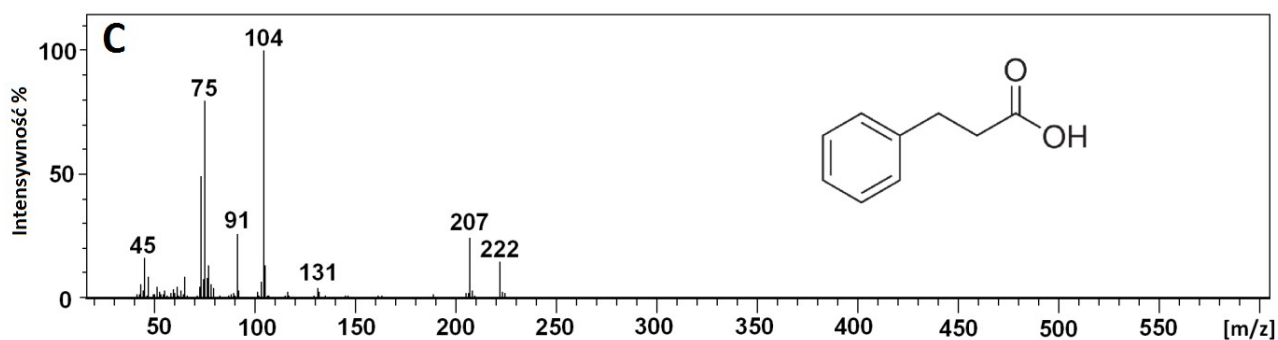
W kwasach tłuszczowych *L. sericata* [H3] i *C. vicina* [H7] określano położenie miejsc nienasycenia. W tym celu kwasy tłuszczowe przeprowadzono w odpowiednie estry metylowe, a następnie przeprowadzono reakcję z disiarczkiem dimetylu i otrzymano pochodną przedstawioną na rysunku 10. Fragmentacja takich związków pozwala jednoznacznie określić miejsce położenia podwójnego wiązania.



Rys. 10. Pochodna kwasu oktadekenowego i jej widmo mas

We frakcjach lipidowych *C. vicina*, *C. vomitoria*, *S. carnaria* i *M. domestica* zidentyfikowano 12 związków nietypowych dla owadów: kwas azelainowy, kwas fenylloctowy, kwas fenylpropionowy, kwas sebacynowy, kwas 2-metylo-2-hydroksybutanowy, 2,4-dekadienal, octan tokoferolu [H13], uracyl, 9-trikozen, monooleinian glicerolu, ester dimetylowy kwasu suberynowego i ester butylowy kwasu stearynowego [H16]. W ciele tłuszczowym *Z. atratus* zidentyfikowano 6 nietypowych dla owadów estrów: ester decylowy kwasu oktanowego (FADE C8:0), ester etylowy kwasu heksadekanowego (FAEE C16:0), ester etylowy kwasu oktadekenowego (FAEE C18:1), ester decylowy kwasu oktanowego (FADDE C8:0), ester etylowy kwasu oktadekanowego (FAEE C18:0) i ester tetradecylowy kwasu oktanowego (FATDE C8:0) [H15]. We frakcji lipidowej wylinek *D. pini* zidentyfikowano tylko jeden nietypowy związek - kwas dehydroabietynowy [H1]. Identyfikacja wszystkich nietypowych dla owadów związków polegała na interpretacji charakterystycznych widm mas i przeprowadzeniu koiniekcji frakcji lipidowej z odpowiednim wzorcem. Przykładowo, rysunek 11 przedstawia TIC otrzymany w wyniku analizy frakcji lipidowej, TIC koiniekcji frakcji lipidowej ze wzorcem oraz widmo mas kwasu fenylpropionowego. W taki sam sposób zidentyfikowano pozostałe, nietypowe dla owadów związki.





Rys. 11. Identyfikacja kwasu fenylopropionowego

#### 4. Skład frakcji lipidowych owadów

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych ośmiu gatunków owadów zidentyfikowano kwasy tłuszczowe, n-alkany, estry, alkohole, sterole i inne związki nietypowe dla owadów.

##### 4.1. Kwasy tłuszczowe

Zazwyczaj we frakcjach lipidowych owadów identyfikowane są kwasy tłuszczowe zawierające od 8 do 26 atomów węgla w łańcuchu, zarówno nasycone, jak i nienasycone zawierające jedno, dwa lub trzy podwójne wiązania [20-25]. Związki te były zidentyfikowane w uzyskanych ekstraktach następujących gatunków owadów:

- *D. pini* (larwy, poczwarki [H1]),
- *L. sericata* (larwy i poczwarki [H14], samice i samce [H3]),
- *F. nigra* (larwy [H6]),
- *C. vicina* (larwy i poczwarki [H7]),
- *C. vomitoria* (larwy, poczwarki, samce i samice [H8]),
- *S. canaria* (larwy, poczwarki, samce i samice [H11]),
- *Z. atratus* (larwy i poczwarki [H15]).

##### *Dendrolimus pini*

W publikacji nienależącej do cyklu habilitacyjnego [26] analizowano kutykularne kwasy tłuszczowe larw *D. pini*. Zidentyfikowano tylko 5 kwasów tłuszczowych: 2 nasycone (C16:0, C18:0) i 3 nienasycone (C18:1, C18:2 i C18:3). Związki te są typowe dla owadów [27-30] z wyjątkiem C18:3, który występuje tylko w niektórych gatunkach. Ciekawy jest fakt, iż w wylinkach tego gatunku owadów zidentyfikowano zupełnie inne, nietypowe kwasy tłuszczowe [H1]. W wylinkach larwalno-larwalnych i larwalno-poczwarkowych zidentyfikowano odpowiednio 27 i 26 kwasów od C8:0 do C34:0. Wszystkie zidentyfikowane kwasy są nasycone. Kwas C23:0 obecny w wylinkach larwalno-larwalnych nie był zidentyfikowany w wylinkach larwalno-poczwarkowych. Zarówno w wylinkach larwalno-larwalnych, jak i w wylinkach larwalno-poczwarkowych w największych

ilościach zidentyfikowane były C20:0, C22:0, C26:0, C28:0, C30:0 i C32:0. Obecność kwasów tłuszczowych we frakcjach lipidowych owadów jest typowa, choć kwasy zawierające powyżej 26 atomów węgla, a zwłaszcza o nieparzystej liczbie atomów węgla są nietypowe. W przypadku wylinek *D. pini* zidentyfikowano kwasy tłuszczowe zawierające powyżej 26 atomów węgla. Funkcja tych związków w wylinkach tych owadów pozostaje nieznana, choć mogą wykazywać one właściwości przeciwgrzybicze. Owady zrzucając wylinki przechodzą z jednego stadium larwalnego w drugie lub gdy następuje przeobrażenie stadium larwalnego w stadium poczwarki. Metamorfoza owadów, oprócz gruntownej przebudowy organizmu, jest również naturalnym procesem pozbywania się szkodliwych mikroorganizmów z powierzchni owadów, a obecność tak dużej liczby kwasów tłuszczowych może dodatkowo zapobiegać infekcjom grzybiczym.

### ***Lucilia sericata***

Kwasy tłuszczowe zostały zidentyfikowane we frakcjach lipidowych larw i poczwarek [H14] oraz samców i samic *L. sericata* [H3]. Larwy posiadają 15 kutykularnych kwasów tłuszczowych od C8:0 do C20:5 oraz 26 wewnętrznych kwasów tłuszczowych od C6:0 do C26:0. W największej ilości na powierzchni kutykuli występowały: C14:0 (6,4%), C16:1 (6,0%), C16:0 (31,8%), C18:1 (42,8%) i C18:0 (8,3%). Na uwagę zasługuje fakt, iż stwierdzono obecność kutykularnych kwasów o 20 atomach węgla w łańcuchu zawierających 4 i 5 miejsc nienasycenia, które występują w śladowych ilościach. Te dwa związki w wewnętrznych frakcjach lipidowych znajdują się w znacznie większych ilościach i stanowią odpowiednio 1,4 i 0,5%. Wewnątrz larw w największej ilości występowały: C14:0 (1,0%), C16:1 (15,4%), C16:0 (20,5%), C18:1 (56,9%), C18:0 (1,2%) i C20:5 (1,4%). Poczwarki zawierają 24 kutykularne i 21 wewnętrzne kwasy tłuszczowe. Spośród kutykularnych kwasów tłuszczowych w największych ilościach występowały C14:0 (1,6%), C16:1 (7,0%), C16:0 (19,5%), C18:1 (60,0%) i C18:0 (8,3%), natomiast w wewnętrznej frakcji lipidowej w największych ilościach były obecne C16:1 (16,0%), C16:0 (29,5%), C18:1 (45,6%), C18:0 (1,9%), C20:5 (3,2%) i C20:4 (1,1%). Podobnie jak we frakcjach lipidowych larw, we frakcjach lipidowych poczwarek obecne są kwasy o 20 atomach węgla zawierające 4 i 5 miejsc nienasycenia. Zidentyfikowano znacznie mniejsze ilości kutykularnych kwasów tłuszczowych w porównaniu do kwasów wewnętrznych. Na powierzchni kutykuli samic i samców zidentyfikowano kwasy tłuszczowe zawierające od 6 do 20 atomów węgla. Obecne były również kwasy o 20 atomach węgla zawierające 4 i 5 miejsc nienasycenia. Do nietypowych związków obecnych w kutykularnych frakcjach lipidowych samców i samic można zaliczyć kwasy tłuszczowe o nieparzystej liczbie atomów węgla (C7:0, C9:0, C11:0, C15:0 i C17:0). Te nietypowe związki występują w niewielkich ilościach (od śladowych ilości do 3,6%). Znacznie więcej

zidentyfikowano wewnętrznych kwasów tłuszczowych. Kwasy wewnętrzne samic i samców zawierają od 6 do 26 atomów węgla w łańcuchu. W wewnętrznej frakcji lipidowej zidentyfikowano nienasycony kwas tłuszczowy o nieparzystej liczbie atomów węgla C17:1 oraz kwasy nasycone zawierające 22, 24 i 26 atomów węgla w łańcuchu, których nie było w kutykularnych frakcjach lipidowych. Zidentyfikowano 15 kutykularnych kwasów tłuszczowych u samców, a w największych ilościach występowały kwasy z parzystą liczbą atomów węgla: C16:1 (10,3%) C16:0 (29,4%), C18:1 (40,6%) i C18:0 (6,7%). Z kolei spośród wykrytych u samców 21 wewnętrznych kwasów tłuszczowych w największych ilościach występowały C16:1 (14,7%), C16:0 (19,5%), C18:1 (57,4%) i C20:0 (4,2%). Charakterystyczne tylko dla wewnętrznych frakcji lipidowych samców były: C17:1, C18:2, C19:0, C20:1, C20:0, C22:0, C24:0 i C26:0, natomiast kwasy C10:0 i C11:0 występowały tylko w kutykularnych frakcjach lipidowych. Zidentyfikowano 16 kutykularnych kwasów tłuszczowych samic, a w największej ilości występowały: C16:1 (15,2%), C16:0 (31,8%), C18:1 (25,0%) i C18:0 (8,0%). Zidentyfikowane również zostały 24 wewnętrzne kwasy tłuszczowe u samic, a w największej ilości były obecne: C16:1 (17,5%) C16:0 (21,0%), C18:1 (53,2%) i C20:0 (4,0%). Charakterystyczne dla wewnętrznych frakcji lipidowych samic były następujące kwasy: C14:1, C17:1, C17:0, C18:2, C19:0, C20:1, C22:0, C24:0 i C26:0, natomiast kwas C11:0 występuje tylko w kutykularnych ekstraktach.

### ***Forcipomyia nigra***

Analizowany był skład wydzieliny pobranej bezpośrednio ze szczecin larw *F. nigra* hodowanych w temperaturze 5 i 20 °C [H6]. Określono również skład kwasów tłuszczowych znajdujących się na powierzchni i wewnątrz larw, a także skład tych związków w podłożu, na którym te owady żyją [H6]. Porównując skład wydzieliny larw hodowanych w temperaturze 5 i 20 °C można stwierdzić, że zawartości kwasów zawierających 16 i 18 atomów węgla w łańcuchu są najwyższe, natomiast zawartości kwasów od C7:0 do C12:0 są znacznie niższe. W wydzielinie larw hodowanych w temp. 5 °C obecne są 3 kwasy występujące w śladowych ilościach, a w wydzielinie larw hodowanych w temp. 20 °C obecnych jest 5 kwasów o zawartości do 2,9%. Analiza frakcji lipidowych pochodzących z całych owadów (z powierzchni i z wnętrza larw) wykazała dodatkowo obecność kwasu zawierającego 5 atomów węgla. W podłożu zidentyfikowano tylko 6 kwasów od C14:0 do C18:0, które występują w największych ilościach w wydzielinie ze szczecin larw *F. nigra*. Wśród kwasów, które zidentyfikowano w wydzielinie larw *F. nigra* hodowanych w 5 i 20 °C zidentyfikowano 3 nienasycone kwasy tłuszczowe (C16:1, C18:1 i C18:2) oraz 2 kwasy z nieparzystą liczbą atomów węgla w łańcuchu (C7:0 i C9:0).

### ***Calliphora vicina***

W kutykularnych frakcjach lipidowych larw *C. vicina* zidentyfikowano 24 kwasy tłuszczowe od C8:0 do C24:0, natomiast wewnętrzne frakcje lipidowe zawierają 26 kwasów od C6:0 do C22:0 [H7]. Zidentyfikowano 15 nasyconych i 9 nienasyconych kutykularnych kwasów larw, a w skład wewnętrznych frakcji lipidowych tego stadium wchodzi 16 nasyconych i 10 nienasyconych kwasów tłuszczowych. W największych ilościach występują następujące kutykularne kwasy: C16:1 (19,7%), C16:0 (18,6%), C18:2 (0,9%), C18:1 (45,6%) i C18:0 (8,5%), natomiast w wewnętrznych frakcjach lipidowych wykryto: C14:0 (6,6%) C16:1 (23,2%), C16:0 (13,6%), C18:1 (53,6%) i C18:0 (1,5%). Spośród głównych kwasów tłuszczowych, kwas C18:2 był obecny tylko w ekstraktach kutykularnych, a kwas C14:0, stanowiący aż 6,8% w wewnętrznych frakcjach lipidowych, w kutykularnych frakcjach larw stanowił tylko 0,3%. Na powierzchni kutykuli i wewnątrz larw zidentyfikowano odpowiednio 4 i 6 kwasów zawierających 20 atomów węgla, a w największych ilościach występowały C20:5 i C20:4. W kutykularnych ekstraktach poczwerek *C. vicina* zidentyfikowano 32 kwasy tłuszczowe od C6:0 do C26:0, natomiast wewnętrzne frakcje lipidowe zawierają tylko 21 kwasów od C7:0 do C26:0 [7]. Na powierzchni kutykuli poczwerek znajduje się 18 nasyconych i 14 nienasyconych kwasów, natomiast wewnątrz tego stadium zidentyfikowano 15 nasyconych i 6 nienasyconych kwasów tłuszczowych. Skład głównych kwasów tłuszczowych larw i poczwerek jest podobny: na powierzchni kutykuli poczwerek w największych ilościach występują C16:1 (16,4%), C16:0 (19,3%), C18:2 (6,9%), C18:1 (41,6%) i C18:0 (8,6%), natomiast w wewnętrznych frakcjach lipidowych: C14:0 (5,2%), C16:1 (18,2%), C16:0 (24,2%), C18:1 (40,9%) i C18:0 (4,8%). Podobnie do larw, we frakcjach lipidowych poczwerek kwas C18:2 był obecny był tylko na kutykuli owadów, natomiast kwas C14:0 stanowiący 5,2% kwasów wewnętrznych, w kutykularnych frakcjach lipidowych stanowił 2,4%. We frakcjach lipidowych poczwerek zidentyfikowano 6 kutykularnych i 2 wewnętrzne kwasy tłuszczowe zawierające 20 atomów węgla. W kutykularnych frakcjach lipidowych były to kwasy: C20:5, C20:4, C20:3, C20:2, C20:1 i C20:0, natomiast w wewnętrznych frakcjach lipidowych zidentyfikowano tylko C20:5 i C20:4.

### ***Calliphora vomitoria***

Analizowano skład kutykularnych i wewnętrznych kwasów tłuszczowych larw, poczwerek, samców i samic *C. vomitoria* [H8]. Zidentyfikowano 24 kutykularne kwasy tłuszczowe larw i 23 kutykularne kwasy poczwerek. Głównymi kutykularnymi kwasami larw były C12:0 (1,3%), C14:0 (4,5%), C16:1 (30,1%), C16:0 (25,7%), C18:2 (2,8%), C18:1 (22,1%) i C18:0 (9,2%). Pozostałe kwasy tłuszczowe występowały w znacznie mniejszych ilościach. W kutykularnych



frakcjach lipidowych larw zidentyfikowano 4 kwasy zawierające 20 atomów węgla: C20:5, C20:4, C20:1 i C20:0, a zawartości każdego z nich wynosiły poniżej 1 %. W największych ilościach w kutykularnych frakcjach lipidowych poczwerek występowały następujące kwasy: C14:0 (4,5%), C16:1 (27,3%), C16:0 (23,6%), C18:2 (2,4%), C18:1 (37,2%) i C18:0 (1,9%). Podobnie jak w ekstraktach lipidowych larw, pozostałe kwasy tłuszczowe poczwerek występowały w znacznie mniejszych ilościach. W kutykularnych frakcjach lipidowych poczwerek zidentyfikowano 3 kwasy zawierające 20 atomów węgla: C20:5, C20:4 i C20:0, a ich zawartości wynosiły również poniżej 1 %. W kutykularnych frakcjach lipidowych samców i samic zidentyfikowano odpowiednio 25 i 24 kwasy tłuszczowe. W największych ilościach u samic i samców występowały następujące kutykularne kwasy: C14:0 (1,8% samce; 1,7% samice), C16:1 (47,9% samce; 28,9% samice), C16:0 (19,3% samce; 25,1% samice), C18:2 (2,2% samce; 6,4% samice), C18:1 (22,5% samce; 30,9% samice) i C18:0 (1,6% samce; 2,6% samice) oraz C20:5 (1,9% samce; 1,7% samice). Na powierzchni kutykuli samców i samic obecne są po 3 kwasy zawierające 20 atomów węgla: C20:5, C20:4 i C20:0, a ich zawartości wynoszą od śladowych ilości do 1,9%. We frakcjach lipidowych samców zidentyfikowano kwasy C24:0 i C15:1, które nie były obecne w na powierzchni kutykuli samic. Z kolei w kutykularnych frakcjach lipidowych samic obecny był kwas C21:0, którego nie zidentyfikowano na kutykuli samców.

Na powierzchni kutykuli i wewnątrz larw, poczwerek, samców i samic w największych ilościach występują następujące kwasy tłuszczowe: C14:0, C16:1, C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0. Procentowa zawartość kwasu C16:1 obecnego wewnątrz larw jest znacznie wyższa niż we frakcjach lipidowych poczwerek, natomiast zawartość kwasów C16:0 i C18:1 jest wyższa we frakcjach lipidowych poczwerek w porównaniu z frakcjami lipidowymi larw. Wewnątrz larw zidentyfikowano 4 kwasy tłuszczowe o 20 atomach węgla (C20:5, C20:4, C20:1 i C20:0), a wewnątrz poczwerek obecnych jest 5 takich związków (C20:5, C20:4, C20:3, C20:1 i C20:0). U dorosłych owadów stwierdzono znaczne różnice w składzie wewnętrznych kwasów tłuszczowych samic i samców. Wewnątrz samców procentowa zawartość kwasów C16:1 i C18:1 jest wyższa niż we frakcjach lipidowych samic, natomiast zawartość kwasu C16:0 jest wyższa we frakcjach lipidowych samic. Wewnątrz samców zidentyfikowano 5 kwasów tłuszczowych o 20 atomach węgla (C20:5, C20:4, C20:3, C20:1 i C20:0), a wewnątrz samic tylko 3 (C20:5, C20:4 i C20:0).

### ***Sarcophaga carnaria***

W ekstraktach kutykularnych larw, poczwerek, samców i samic *S. carnaria* zidentyfikowano 28 kwasów karboksylowych, zarówno nasyconych, jak i nienasyconych od C7:0 do C26:0 [H11]. Związki te były głównymi składnikami kutykularnych frakcji lipidowych *S. carnaria* i stanowiły

ok. 70% związków kutykularnych larw, ok. 97% związków kutykularnych poczwerek i odpowiednio, ponad 85% i 92% związków kutykularnych samców i samic. We frakcjach lipidowych wszystkich stadiów rozwojowych zidentyfikowano największe ilości kwasu oktadekenowego (C18:1). Zawartość tego związku wynosiła dla larw, poczwerek, samców i samic odpowiednio: 44, 146, 924 i 1052 µg/g owada. Na powierzchni samców i samic zidentyfikowano dwa wielonienasycone kwasy C20:5 i C20:4, a w ekstraktach poczwerek tylko C20:4, natomiast w kutykularnych frakcjach lipidowych larw nie zidentyfikowano tych związków. Zidentyfikowano również 27 wewnętrznych kwasów karboksylowych larw, poczwerek, samców i samic *S. carnaria*, które zawierały od 9 do 27 atomów węgla w cząsteczce [H11]. Wśród wewnętrznych kwasów karboksylowych w największych ilościach występował kwas C18:1. Zawartość tego związku wynosiła dla larw, poczwerek, samców i samic odpowiednio: 11,0, 7,2, 4,6 i 5,3 mg/g owada. W wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic zidentyfikowano także dwa wielonienasycone kwasy: C20:5 i C20:4.

### ***Zophobas atratus***

Analizowano wpływ hormonu adypokinetycznego (AKH) (po 24 i 48 godzinach od wstrzyknięcia) na skład ciała tłuszczowego larw i poczwerek *Z. atratus* [H15]. W ciele tłuszczowym larw stwierdzono obecność 10 kwasów tłuszczowych od C6:0 do C18:0. W największych ilościach występowały C16:0, C18:1 i C18:0, natomiast w znacznie mniejszych ilościach występowały C14:0, C16:1 i C18:2, a procentowe zawartości kwasów C6:0, C8:0, C10:0 i C12:0 wynosiły poniżej 1,5%. W ciele tłuszczowym poczwerek stwierdzono również obecność 10 kwasów tłuszczowych, a w największych ilościach występowały C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0. Pozostałe kwasy występowały w znacznie mniejszych ilościach - poniżej 2%. Zawartość kwasów tłuszczowych w ciele tłuszczowym larw wzrosła pod wpływem hormonu AKH. Wyższy wzrost zawartości zaobserwowano po 24 godzinach od wstrzyknięcia pojedynczej dawki AKH niż po 48 godzinach od wstrzyknięcia dwóch dawek. W największych ilościach obecny był kwas C16:0, a pod wpływem hormonu jego zawartość wzrosła dwukrotnie po 24 godzinach. Zawartość kwasu C18:0 również wzrosła po 24 godzinach z 1,8 do 4,0 µg/mg ciała tłuszczowego. Ciekawy jest fakt, iż zawartości nienasyconych kwasów C18:1 i C18:2 po 48 godzinach były niższe niż w ekstrakcie kontrolnym ciała tłuszczowego. Kwasy tłuszczowe larw od C6:0 do C12:0 obecne są w mniejszych ilościach. Zawartości większości kwasów tłuszczowych w ciele tłuszczowym poczwerek były niższe po wstrzyknięciu AKH. Zawartość C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0 w ciele tłuszczowym poczwerek była wyższa niż w ciele tłuszczowych larw. Zawartości kwasów tłuszczowych poczwerek po 24 godzinach od wstrzyknięcia hormonu były niższe o około jedną trzecią w przypadku C16:0

i C18:2 oraz o około jedną czwartą w przypadku C18:1 i C18:0, a po 48 godzinach zawartości kwasów tłuszczowych C14:0, C16:1, C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0 były jeszcze niższe.

## 4.2. Alkohole

Alkohole rzadko występują we frakcjach lipidowych owadów i zazwyczaj posiadają od 22 do 34 atomów węgla w cząsteczce [8, 9, 31, 32]. Związki te zawierające poniżej 22 atomów węgla zidentyfikowano w niewielu gatunkach owadów [21, 27]. Alkohole zostały zidentyfikowane w następujących gatunkach owadów:

- *L. sericata* (larwy i poczwarki [H14], samice i samce [H3]),
- *M. domestica* (larwy, poczwarki, samce i samice [H5]),
- *C. vomitoria* (larwy, poczwarki, samce i samice [H9]),
- *Z. atratus* (larwy, poczwarki [H15]).

### *Lucilia sericata*

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwarek, samców i samic *L. sericata* zidentyfikowano 10 alkoholi od C10:0 do C28:0 [H3] i [H14]. Wszystkie zidentyfikowane alkohole posiadają parzystą liczbę atomów węgla i są nasycone. Larwy zawierają tylko 4 kutykularne alkohole w niewielkich ilościach. Spośród nich 3 alkohole (C14:0, C16:0 i C18:0) występują w porównywalnych ilościach, a C26:0 obecny był w śladowych ilościach. W wewnętrznych frakcjach lipidowych larw nie zidentyfikowano alkoholi, natomiast we frakcjach kutykularnych poczwarek zidentyfikowano 9 alkoholi. Dominują 2 alkohole (C24:0 i C26:0), 3 występują w mniejszych ilościach (C12:0, C14:0 i C16:0), a pozostałe 4 (C18:0, C20:0, C22:0 i C28:0) obecne są w śladowych ilościach. W wewnętrznych frakcjach lipidowych poczwarek (podobnie jak w wewnętrznych frakcjach lipidowych larw) nie zidentyfikowano alkoholi. W samcach zidentyfikowano tylko 5 kutykularnych alkoholi od C12:0 do C20:0 w niewielkich ilościach, natomiast w samicach zidentyfikowano 7 kutykularnych alkoholi od C10:0 do C22:0, również w niewielkich ilościach. Wewnątrz samców i samic *L. sericata* zidentyfikowano tylko śladowe ilości alkoholi. W przypadku samców były to: C14:0, C20:0, C22:0, C24:0 i C26:0, a w przypadku samic tylko C14:0, C20:0 i C22:0.

### *Musca domestica*

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwarek, samców i samic *M. domestica* zidentyfikowano 10 alkoholi od C12:0 do C30:0 [H5]. Wszystkie zidentyfikowane alkohole posiadają parzystą liczbę atomów węgla i są nasycone. Na powierzchni kutykuli larw

obecnych jest tylko 8 alkoholi, a dominującym związkiem jest C12:0, który stanowi 70,4% wszystkich alkoholi. Kolejne 3 alkohole (C14:0, C16:0 i C18:0) występują w znacznie mniejszej ilości i stanowią od 3,5% do 14,2%, natomiast zawartości pozostałych alkoholi od C20:0 do C30:0 wynosiły do 1,3%. Również w kutykularnych frakcjach lipidowych poczwerek dominującym alkoholem jest C12:0 (31,0%). Pozostałe alkohole od C14:0 do C30:0 występują w mniejszych ilościach od 3,7% do 14,4%, z wyjątkiem C22:0, który występuje w śladowych ilościach. Wewnątrz larw nie zidentyfikowano alkoholi, a w wewnętrznych frakcjach lipidowych poczwerek zidentyfikowano 5 alkoholi w ilościach śladowych: C18:0, C20:0, C22:0, C24:0 i C26:0.

Na powierzchni samców i samic zidentyfikowano odpowiednio 8 i 9 alkoholi, spośród których w największych ilościach występowały C12:0 i C24:0. Na kutykuli samców nie zidentyfikowano alkoholu C22:0, który we frakcjach lipidowych samic stanowił 11,9% wszystkich alkoholi. Zawartość alkoholu C20:0 była wyższa u samic niż u samców (9,4% samice; 3,0% samce). Również zawartość alkoholu C16:0 była wyższa we frakcjach uzyskanych z samic (4,5% samice; 1,5% samce), natomiast zawartość alkoholu C24:0 jest wyższa w ekstraktach lipidowych samców (57,5% samce; 36,5% samice). Wewnątrz samców i samic zidentyfikowano tylko dwa alkohole C18:0 i C20:0. W ekstraktach uzyskanych z samców występowały one w ilościach śladowych, natomiast w ekstraktach uzyskanych z samic ich zawartości wynosiły odpowiednio 3,6 i 5,0 µg/g owada.

### ***Calliphora vomitoria***

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwerek i samców *C. vomitoria* zidentyfikowano odpowiednio 7, 6 i 5 alkoholi [H9]. Na powierzchni kutykuli samic nie zidentyfikowano żadnych alkoholi. Alkohol C12:0 był zidentyfikowany na powierzchni kutykuli larw i stanowił 4,8% wszystkich alkoholi, natomiast alkohol C14:0 został zidentyfikowany tylko w larwach i poczwarkach, a C16:0 w larwach, poczwarkach i samcach. Zawartości kutykularnych alkoholi C18:0 i C20:0 u larw i poczwerek są porównywalne, natomiast ich zawartość we frakcjach lipidowych samców jest znacznie niższa. Z kolei zawartość alkoholu C22:0 jest znacznie wyższa na powierzchni samców w porównaniu do frakcji lipidowych larw i poczwerek i stanowi 60,2%.

Wewnątrz larw wykryto tylko jeden alkohol (C22:0), natomiast wewnątrz samców zidentyfikowano 4 alkohole w ilościach śladowych (C18:0, C20:0, C22:0 i C24:0). W wewnętrznych frakcjach lipidowych poczwerek i samic były obecne po 4 alkohole: C18:0, C20:0, C22:0 i C24:0, a alkoholem o najwyższej zawartości w poczwarkach był C18:0 (53,4%), natomiast w samicach C22:0 (59,0%).

### ***Zophobas atratus***

Analizowano wpływ hormonu adypokinetycznego (AKH) (po 24 i 48 godzinach od wstrzyknięcia owadom) na skład alkoholi ciała tłuszczowego larw i poczwerek *Z. atratus* [H15]. W ciele tłuszczowym larw stwierdzono obecność 5 alkoholi. W największych ilościach występował alkohol C10:0 i stanowił on od 91,7% w ciele tłuszczowym larw kontrolnych do 67,5% w ciele tłuszczowym larw po 48 godzinach od wstrzyknięcia hormonu AKH. W znacznie mniejszych ilościach występowały C12:0, C14:0, C16:0 i C18:0. Porównując zawartości alkoholi ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  ciała tłuszczowego) można stwierdzić, że zawartości wszystkich alkoholi wzrastają po wstrzyknięciu hormonu.

W ciele tłuszczowym poczwerek również stwierdzono obecność 5 alkoholi. W największych ilościach występował alkohol C10:0, który stanowił od 79,2% alkoholi w ciele tłuszczowym larw kontrolnych do 83,2% w ciele tłuszczowym larw po 24 godzinach od wstrzyknięcia hormonu AKH. Podobnie jak w ciele tłuszczowym larw, w ciele tłuszczowym poczwerek pozostałe alkohole (C12:0, C14:0, C16:0 i C18:0) były obecne w znacznie mniejszych ilościach.

### **4.3. n-alkany**

Kolejną grupą związków były n-alkany, które zostały zidentyfikowane we frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *L. sericata* [H4]. Związki te są typowymi składnikami tych frakcji i u niektórych gatunków owadów pełnią rolę feromonów [6, 33-38].

### ***Lucilia sericata***

Na powierzchni kutykuli larw zidentyfikowano 7 n-alkanów od C23 do C31, natomiast w kutykularnych frakcjach lipidowych poczwerek zidentyfikowano aż 18 n-alkanów [H4]. W ekstraktach lipidowych larw i poczwerek dominują C27, C29 i C31, a pozostałe n-alkany o parzystej liczbie atomów węgla występują w znacznie mniejszych ilościach. Zidentyfikowano również odpowiednio 16 i 17 kutykularnych n-alkanów samców i samic. Głównymi związkami w tej grupie są C23, C25 i C27. Zawartość kutykularnych n-alkanów samców i samic jest zbliżona. Przykładowo, zawartość kutykularnego C27 samców i samic wynosi odpowiednio 47,9 i 47,5%. Pozostałe kutykularne n-alkany występują w znacznie mniejszych ilościach, od śladowych ilości do 3,4%.

W wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic zidentyfikowano odpowiednio 5, 7, 5 i 4 n-alkany zawierające od 23 do 31 atomów węgla. Dominują n-alkany o nieparzystej liczbie atomów węgla. Porównując n-alkany larw i poczwerek można stwierdzić,

że zawartość C25 jest znacznie wyższa w wewnętrznych frakcjach lipidowych larw (22,4% w larwach; 4,4% w poczwarkach). Wewnątrz poczwarek obecne są 2 n-alkany o parzystej liczbie atomów węgla, których brak w ekstraktach z larw (C26 i C30). Porównując n-alkany samców i samic można stwierdzić, że zawartość C23 jest znacznie wyższa wewnątrz samic (2,3% samce; 24,0% samice). W ekstraktach lipidowych samców obecny jest 1 n-alkan o parzystej liczbie atomów węgla, którego brak w ekstraktach samic (C28).

#### 4.4. Estry

Estry metylowe kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidowych owadów występują w niewielkich ilościach i często pełnią rolę feromonów [27, 39-42]. W moich badaniach estry były zidentyfikowane u następujących gatunków owadów:

- *C. vomitoria* (larwy, poczwarki, samce i samice [H9]),
- *Z. atratus* (larwy, poczwarki [H15]).

#### ***Calliphora vomitoria***

W ekstraktach kutykularnych larw zidentyfikowano 6, a w ekstraktach poczwarek 7 estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Zidentyfikowano zarówno nasycone, jak i nienasycone estry zawierające zarówno parzystą, jak i nieparzystą liczbę atomów węgla, choć estrów o nieparzystej liczbie atomów węgla jest więcej i występują w większych ilościach. Głównymi estrami we frakcjach lipidowych larw i poczwarek są C17:1 i C19:1. Procentowa zawartość estru C17:1 jest wyższa we frakcjach lipidowych larw (55,4% w larwach; 42,5% w poczwarkach), a estru C19:1 jest wyższa we frakcjach lipidowych poczwarek (33,9% w larwach; 42,0% w poczwarkach). Zawartość pozostałych estrów jest znacznie niższa.

Na powierzchni kutykuli samców zidentyfikowano 5, a w ekstraktach lipidowych samic 7 estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Tak samo jak w przypadku larw i poczwarek, zidentyfikowano zarówno nasycone, jak i nienasycone estry zawierające zarówno parzystą, jak i nieparzystą liczbę atomów węgla. Estrów o nieparzystej liczbie atomów węgla jest więcej i występują w większych ilościach. Głównymi estrami na powierzchni kutykuli samców i samic są C17:1 i C19:1. Procentowa zawartość estru C17:1 jest niemal taka sama we frakcjach lipidowych samców i samic (30,1% samce; 29,9% samice), a zawartość estru C19:1 jest wyższa we frakcjach lipidowych samców (57,8% samce; 44,6% samice). Na powierzchni kutykuli samic zidentyfikowano

ester C19:2, którego nie było na powierzchni kutykuli samców. Zawartość pozostałych estrów jest znacznie niższa.

Wewnętrzne frakcje lipidowe larw i poczwerek zawierają odpowiednio 9 i 10 estrów. Wewnątrz larw i poczwerek w największej ilości były zidentyfikowane C17:1 i C19:1. Tak samo jak na powierzchni kutykuli, w wewnętrznych frakcjach lipidowych procentowa zawartość estru C17:1 jest wyższa wewnątrz larw (57,1% w larwach; 35,8% w poczwarkach), a estru C19:1 jest wyższa wewnątrz poczwerek (31,0% w larwach; 43,3% w poczwarkach). Zawartość pozostałych estrów jest znacznie niższa.

W wewnętrznych frakcjach lipidowych samców zidentyfikowano 6, a we frakcjach lipidowych samic 7 estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Profile estrów wewnętrznych samców i samic są podobne do profili kutykularnych. Głównymi wewnętrznymi estrami samców i samic są C17:1 i C19:1. Wewnątrz samców i samic procentowa zawartość estru C17:1 jest niemal taka sama (34,8% samce; 34,1% samice), a zawartość estru C19:1 jest wyższa we frakcjach lipidowych samców (54,3% samce; 50,6% samice). Wewnątrz samic zidentyfikowano ester C19:2, którego nie było w wewnętrznych frakcjach lipidowych samców. Zawartość pozostałych estrów jest znacznie niższa.

### ***Zophobas atratus***

W ciele tłuszczowym larw i poczwerek zidentyfikowano 15 estrów metylowych. W największej ilości występują estry metylowe następujących kwasów tłuszczowych: C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0. Porównując procentowe zawartości estrów w ciele tłuszczowym larw można stwierdzić, że zawartości estrów metylowych kwasów C16:0 i C18:2 są wyższe po wstrzyknięciu hormonu AKH zarówno po 24, jak i po 48 godzinach, natomiast zawartość estru metylowego kwasu C18:1 maleje. Porównując procentowe zawartości estrów w ciele tłuszczowym poczwerek można stwierdzić, że zawartość estru metylowego kwasu C16:0 jest wyższa po wstrzyknięciu hormonu AKH zarówno po 24, jak i po 48 godzinach, natomiast zawartości estrów metylowych kwasów C18:2 i C18:1 po tym zabiegu maleją. Zawartości (w µg/mg ciała tłuszczowego) estrów metylowych kwasów C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0 po wstrzyknięciu hormonu AKH, zarówno w przypadku larw, jak i poczwerek po 24 godzinach maleją, a po 48 godzinach wzrastają.

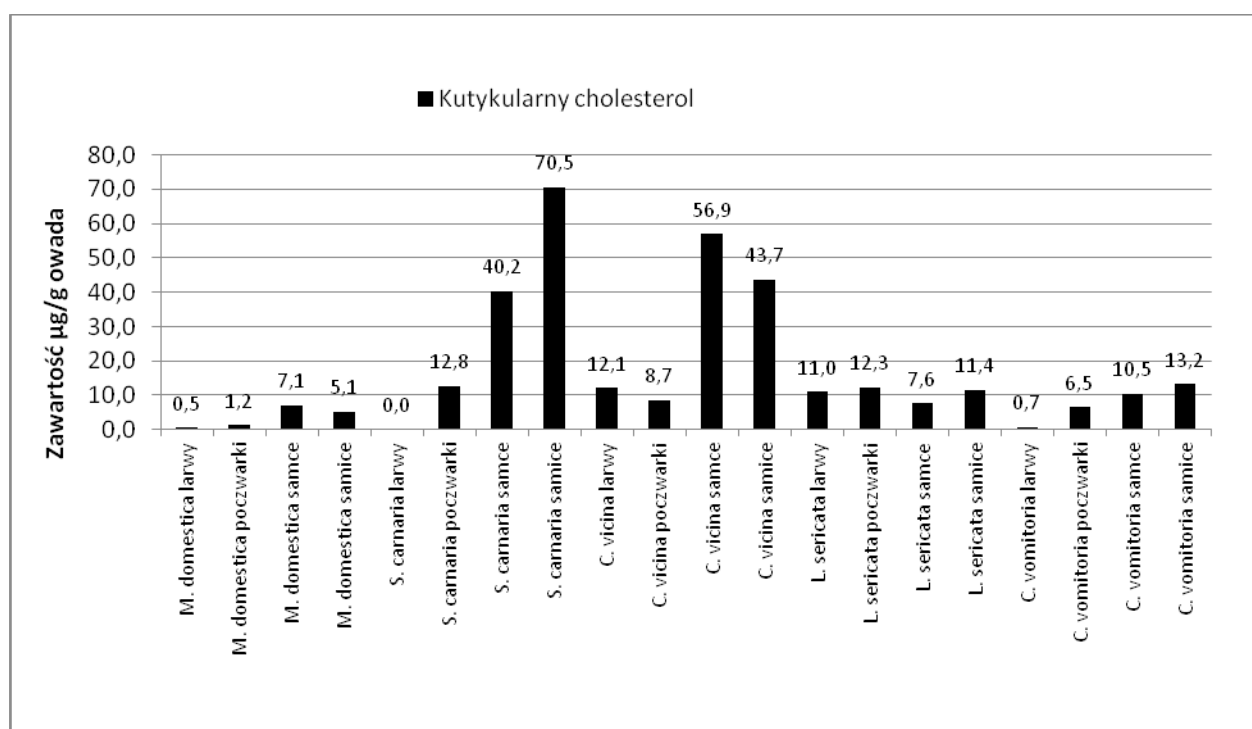
### **4.5. Sterole**

Sterole odgrywają ważną rolę podczas rozwoju owadów, zwłaszcza cholesterol, który jest prekursorem ekdysteroidów [43-47]. Owady nie syntezują cholesterolu, dlatego pobierają sterole wraz z pożywieniem i przekształcają je do cholesterolu [48]. Najczęściej występującym sterolem

w kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych był cholesterol (Rys. 12). Został on zidentyfikowany w następujących gatunkach owadów:

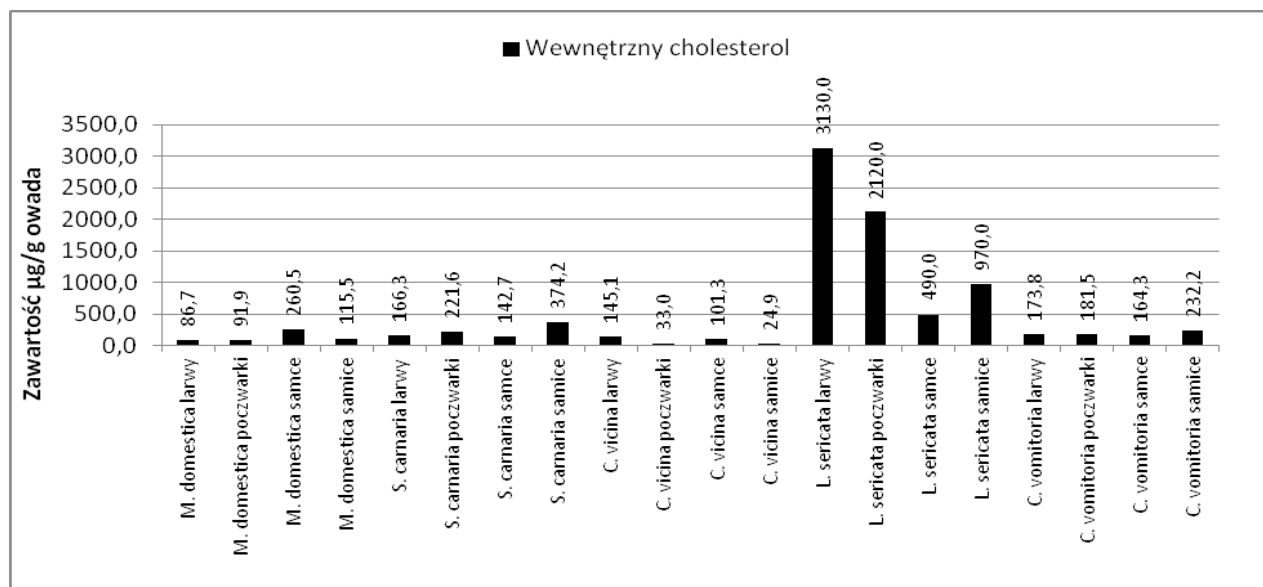
- *M. domestica* (larwy, poczwarki, samce i samice [H10]),
- *L. sericata* (larwy i poczwarki [H14], samice i samce [H3]),
- *C. vicina* (larwy, poczwarki, samce i samice [H10]),
- *C. vomitoria* (larwy, poczwarki, samce i samice [H9]),
- *S. canaria* (larwy, poczwarki, samce i samice [H10]),
- *Z. atratus* (larwy i poczwarki [H15]).

Spośród analizowanych gatunków owadów zawartość kutykularnego cholesterolu samic *S. canaria* jest najwyższa (70,5 µg/g owada). Znacznie mniej cholesterolu posiadają samce i poczwarki tego gatunku (odpowiednio 40,2 i 12,8 µg/g owada), natomiast na powierzchni kutykuli larw cholesterolu nie zidentyfikowano. Inne proporcje cholesterolu występują we frakcjach lipidowych *C. vicina*. Wyższą zawartość cholesterolu stwierdzono na powierzchni kutykuli samców w porównaniu do samic, natomiast we frakcjach lipidowych larw i poczwerek stwierdzono około 4-5-krotnie niższą zawartość cholesterolu. Na powierzchni kutykuli samców i samic *M. domestica* stwierdzono znacznie więcej cholesterolu niż we frakcjach lipidowych larw i poczwerek, natomiast na powierzchni kutykuli larw, poczwerek, samców i samic *L. sericata* zawartość cholesterolu jest zbliżona. Podobną zawartość cholesterolu stwierdzono także na powierzchni kutykuli *C. vomitoria* z wyjątkiem ekstraktów lipidowych larw, gdzie zawartość cholesterolu wynosi tylko 0,7 µg/g owada.



Rys. 12. Zawartość cholesterolu kutykularnego





**Rys.13.** Zawartość cholesterolu wewnętrznego

W analizowanych gatunkach owadów zawartość cholesterolu wewnętrznego jest znacznie wyższa niż kutykularnego. Najwyższą zawartość stwierdzono wewnątrz larw, poczwerek, samców i samic *L. sericata*. Zwłaszcza duża zawartość występuje we frakcjach lipidowych larw (3130,0 µg/g owada) i poczwerek (2120,0 µg/g owada). Zawartość wewnętrznego cholesterolu samic i samców *L. sericata* także jest stosunkowo duża (odpowiednio 970,0 i 490,0 µg/g owada). W przypadku *M. domestica* najwyższą zawartość cholesterolu stwierdzono wewnątrz samców (260,5 µg/g owada), a niższą wewnątrz samic (115,5 µg/g owada). Zawartość cholesterolu poniżej 100 µg/g owada była stwierdzona w ekstraktach lipidowych larw i poczwerek *M. domestica*. Wewnątrz pozostałych gatunków owadów, zawartość powyżej 200 µg/g owada stwierdzono we frakcjach lipidowych poczwerek i samic *S. carnaria* oraz samic *C. vomitoria*, natomiast zawartość powyżej 100 µg/g owada stwierdzono wewnątrz larw i samców *S. carnaria*, larw i samców *C. vicina* oraz larw, poczwerek i samców *C. vomitoria*. Najniższą zawartość cholesterolu wewnętrznego stwierdzono wewnątrz poczwerek i samic *C. vicina* (poniżej 40 µg/g owada).

Inne sterole (oprócz cholesterolu) były zidentyfikowane w następujących gatunkach owadów:

- *M. domestica* (larwy [H10]),
- *Z. atratus* (larwy i poczwarki [H15]).

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *M. domestica* zidentyfikowano 7 steroli: cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, sitosterol, sitostanol i fukosterol [H10]. Na powierzchni kutykuli larw i poczwerek w największej

ilości występował sitosterol (odpowiednio 74,0% i 57,9%). Cholesterol, kampesterol i stigmasterol występowały w znacznie mniejszych ilościach: od 2,4% kampesterolu do 18,7% cholesterolu na powierzchni kutykuli larw. Na powierzchni kutykuli poczwerek zidentyfikowano sitostanol, którego zawartość wynosiła 9,1%, a we frakcjach lipidowych larw związek ten występował w ilościach śladowych. Na powierzchni kutykuli larw i poczwerek stwierdzono obecność śladowych ilości kampestanolu, natomiast fukosterol był obecny tylko w kutykularnych frakcjach lipidowych larw w ilościach śladowych. Na powierzchni kutykuli samców i samic *M. domestica* w największej ilości występował cholesterol (odpowiednio 79,9% i 76,3%). Kampesterol i sitosterol występowały w znacznie mniejszych ilościach: od 7,5% sitosterolu w ekstraktach lipidowych samców do 12,7% kampesterolu we frakcjach lipidowych samic. Na powierzchni kutykuli samców i samic stwierdzono obecność śladowych ilości kampestanolu i sitostanolu, natomiast stigmasterol był obecny tylko w na powierzchni samic w ilościach śladowych.

Wewnątrz larw, poczwerek, samców i samic *M. domestica* w największej ilości występował cholesterol (odpowiednio 54,7%, 57,4%, 73,2% i 75,1%). Sitosterol i kampesterol występowały w mniejszych ilościach od 8,1% sitosterolu we frakcjach lipidowych samic do 28,7% kampesterolu wewnątrz larw. W wewnętrznych frakcjach lipidowych larw i poczwerek zidentyfikowano stigmasterol, który nie występował wewnątrz samców i samic, natomiast fukosterol był obecny tylko w wewnątrz poczwerek.

W ciele tłuszczowym larw i poczwerek *Z. atratus* zidentyfikowano tylko 2 sterole: cholesterol i sitosterol [H15]. Po wstrzyknięciu hormonu AKH larwom, po 24 godzinach zawartość cholesterolu wzrosła, a po 48 godzinach zmalała, natomiast zawartość cholesterolu w ciele tłuszczowym poczwerek maleje zarówno po 24, jak i po 48 godzinach. Zawartość sitosterolu w ciele tłuszczowym larw i poczwerek jest znacznie niższa.

#### 4.6. Nietypowe dla owadów związki zidentyfikowane we frakcjach lipidowych owadów

Identyfikacja nietypowych dla owadów związków jest bardzo ważnym zadaniem naukowym, ponieważ może dostarczyć „nowych” związków wykazujących aktywność biologiczną. Związki te mogą być feromonami lub związkami obronnymi owadów. Mogą być one syntezowane przez owady lub pobierane przez owady wraz z pożywieniem. Przykładowo, 9-trikozen został zidentyfikowany jako feromon muchy domowej [49, 50], natomiast ester dimetylowy kwasu suberynowego został zidentyfikowany w roślinach *Hibiscus micranthus* i *Astragalus membranaceus* [51, 52] oraz w algach *Polysiphonia denudata f. fragilis* [53]. We frakcjach lipidowych owadów zidentyfikowano następujące związki nietypowe dla owadów:

- kwas dehydroabietynowy [H1],

- kwas azelainowy [H13],
- kwas sebacynowy [H13],
- kwas 2-metylo-2-hydroksybutanowy [H13],
- kwas fenylloctowy [H13],
- kwas fenylpropionowy [H13],
- 2,4-dekadienal [H13],
- octan tokoferolu [H13],
- uracyl [H16],
- 9-trikozen [H16],
- monoolinian glicerolu [H16],
- ester dimetylowy kwasu suberynowego [H16],
- ester butylowy kwasu stearynowego [H16],
- ester decylowy kwasu oktanowego (FADE C8:0) [H15],
- ester etylowy kwasu heksadekanowego (FAEE C16:0) [H15],
- ester etylowy kwasu oktadekenowego (FAEE C18:1) [H15],
- ester dodecylowy kwasu oktanowego (FADDE C8:0) [H15],
- ester etylowy kwasu oktadekanowego (FAEE C18:0) [H15],
- ester tetradecylowy kwas oktanowego (FATDE C8:0) [H15].

### ***Dendrolimus pini***

W wylinkach larwalno-larwalnych i larwalno-poczwarkowych *D. pini* zidentyfikowano kwas dehydroabietynowy. Związek ten wytwarzany jest przez drzewa iglaste i stanowi on składnik żywic. Kwasy diterpenowe hamują kiełkowanie zarodników i wzrost grzybni w ten sposób chroniąc rośliny przed infekcjami grzybiczymi. Prawdopodobnie owady pobierając ten związek z pożywieniem wykorzystują go do ochrony przed entomopatogenicznymi grzybami. Zawartość kwasu dehydroabietynowego w wylinkach larwalno-larwalnych i larwalno-poczwarkowych wynosiła odpowiednio 1,8 i 11,5 mg/g wylinki.

### ***Calliphora vicina***

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwarek, samców i samic *C. vicina* zidentyfikowano kwas azelainowy. W przypadku larw i samców zawartość tego kwasu na powierzchni kutykuli jest wyższa niż wewnątrz owadów, natomiast w przypadku samic większe ilości tego związku znajdują się wewnątrz. Zawartość tego związku jest porównywalna w kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych poczwarek. Na powierzchni kutykuli

i wewnątrz poczwerek zidentyfikowano także kwas fenylooctowy w porównywalnych ilościach (odpowiednio 4,86 i 4,98  $\mu\text{g/g}$ ). Około dwukrotnie więcej tego związku zidentyfikowano w wewnątrz samic, natomiast wewnątrz samców występował on w ilościach śladowych. W kutykularnych frakcjach lipidowych poczwerek zidentyfikowano również niewielkie ilości kwasu 2-metylo-2-hydroksybutanowego (0,06  $\mu\text{g/g}$ ) oraz śladowe ilości 2,4-dekadienu. Uracyl został zidentyfikowany tylko wewnątrz samców i samic, natomiast monooleinian glicerolu został zidentyfikowany tylko wewnątrz larw i poczwerek. Z kolei ester dimetylowy kwasu suberynowego zidentyfikowano w niewielkich ilościach w kutykularnych frakcjach lipidowych larw i poczwerek. Kolejnym związkiem jest 9-trikozen, który zidentyfikowano na powierzchni kutykuli i wewnątrz larw, poczwerek, samców i samic. Zawartość tego związku jest stosunkowo wysoka we frakcjach lipidowych samców i samic (23,96  $\mu\text{g/g}$  wewnątrz samców; 58,44  $\mu\text{g/g}$  wewnątrz samic). Zawartość tego związku we frakcjach lipidowych larw i poczwerek jest znacznie niższa i wynosi 0,13  $\mu\text{g/g}$  wewnątrz poczwerek i 6,67  $\mu\text{g/g}$  wewnątrz larw.

### ***Calliphora vomitoria***

Kwas azelainowy zidentyfikowano w kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *C. vomitoria*. Większe ilości tego związku były wewnątrz niż na powierzchni kutykuli poczwerek, samców i samic. Jedynie we frakcjach lipidowych larw było więcej tego związku na powierzchni owadów. Kwas fenylooctowy został zidentyfikowany na powierzchni kutykuli i wewnątrz (większe ilości tego związku były obecne wewnątrz) larw i samców oraz tylko wewnątrz poczwerek i samic. Niewielkie ilości fenylopropionowego zidentyfikowano na powierzchni kutykuli larw i śladowe ilości w wewnętrznych frakcjach lipidowych. Frakcje lipidowe poczwerek, samców i samic nie zawierają tego związku. Uracyl występuje na powierzchni kutykuli i wewnątrz larw, poczwerek, samców i samic. Zawartość tego związku jest dużo wyższa wewnątrz owadów niż na powierzchni kutykuli. Przykładowo, na powierzchni kutykuli samic zawartość tego związku wynosi 0,52  $\mu\text{g/g}$ , a wewnątrz 46,30  $\mu\text{g/g}$ . Monooleinian glicerolu zidentyfikowano na powierzchni kutykuli i wewnątrz poczwerek i samic oraz tylko na powierzchni kutykuli larw i samców. Zawartości tego związku w wewnętrznych frakcjach lipidowych poczwerek i samic są dużo wyższe w porównaniu do frakcji kutykularnych.

### ***Sarcophaga carnaria***

Kwas azelainowy zidentyfikowano tylko na powierzchni kutykuli larw i poczwerek *S. carnaria* (odpowiednio 0,95 i 0,19  $\mu\text{g/g}$  owada). Również na powierzchni kutykuli larw i poczwerek w małych ilościach zidentyfikowano kwas sebacynowy (odpowiednio 0,13 i 0,17  $\mu\text{g/g}$  owada). Kwas fenylooctowy zidentyfikowano tylko wewnątrz larw, poczwerek, samców i samic. Zawartość tego związku wynosiła od 0,16 we frakcjach lipidowych poczwerek do 3,03  $\mu\text{g/g}$  we frakcjach lipidowych samic. Kwas fenylopropionowy został zidentyfikowany wewnątrz larw w śladowych ilościach oraz na powierzchni kutykuli i wewnątrz poczwerek (odpowiednio 0,55 i 1,13  $\mu\text{g/g}$ ).

### ***Musca domestica***

Spośród analizowanych gatunków owadów tylko na powierzchni kutykuli larw *M. domestica* zidentyfikowano octan tokoferolu (0,14  $\mu\text{g/g}$ ). Kutykularne i wewnętrzne frakcje lipidowe poczwerek, samców i samic nie zawierają tego związku.

### ***Zophobas atratus***

W ciele tłuszczowym larw i poczwerek *Z. atratus* zidentyfikowano 6 nietypowych estrów: ester decyloowy kwasu oktanowego, ester etyloowy kwasu heksadekanowego, ester etyloowy kwasu oktadekenowego, ester decyloowy kwasu oktanowego, ester etyloowy kwasu oktadekanowego i ester tetradecyloowy kwasu oktanowego. Spośród nietypowych estrów FADE 8:0 występował w największej ilości. Jego zawartość była około dwukrotnie wyższa w ciele tłuszczowym larw i około trzykrotnie wyższa w ciele tłuszczowym poczwerek po 24 godzinach po wstrzyknięciu hormonu AKH. Hormon ten również indukuje wzrost zawartości FADDE 8:0 i FATDE 8:0. Zawartość estrów etylowych FAEE 16:0, FAEE 18:1 i FAEE 18:0 była po 24 godzinach od wstrzyknięciu hormonu niższa w ciele tłuszczowym poczwerek, a w ciele tłuszczowym larw spadła niemal do zera, natomiast po 48 godzinach zawartość ich była równa (FAEE 18:1) lub wyższa (FAEE 16:0 i 18:0) niż w ciele tłuszczowym larw kontrolnych.

## **4.7. Zastosowanie Two-Ways Hierarchic Cluster Analysis**

Two-Ways Hierarchic Cluster Analysis została zastosowana do określenia podobieństw i różnic pomiędzy kutykularnymi i wewnętrznymi frakcjami lipidowymi wszystkich stadiów rozwojowych *L. sericata* [H14]. Dzięki zastosowaniu two-ways HCA zostały zidentyfikowane 3 główne klaster (A, B i C). Pierwszy klaster (A) zawiera kutykularne związki samców i samic, drugi (B) zawiera kutykularne związki larw i poczwerek, a trzeci (C) wewnętrzne związki larw, poczwerek, samców i samic. Zostały również zidentyfikowane 3 kolejne klaster I, II i III. Pierwszy

klaster (I) zawiera tylko jeden związek – kwas C18:1n-9, drugi klaster zawiera kwasy tłuszczowe (16:0, 16:1n-9), cholesterol i n-alkany (n-C<sub>31</sub>, n-C<sub>29</sub>, n-C<sub>27</sub>, n-C<sub>25</sub>, n-C<sub>23</sub>), natomiast trzeci klaster (III) zawiera pozostałe związki. Na podstawie two-ways HCA stwierdzono, że kutykularne związki larw i poczwerek zawierają bardzo duże ilości kwasu C18:1n-9. Również duże ilości tego kwasu zawierają wewnętrzne frakcje lipidowe larw, poczwerek, samców i samic. Zawartości kwasów C16:1n-9, C16:0, cholesterolu i n-alkanów n-C<sub>31</sub>, n-C<sub>29</sub> oraz n-C<sub>27</sub> różnią się pomiędzy poszczególnymi frakcjami lipidów, natomiast pozostałe związki występują na tym samym poziomie.

## 5. Wrażliwość różnych stadiów rozwojowych trzech gatunków owadów na infekcję *Conidiobolus coronatus*

W celu sprawdzenia czy istnieje korelacja pomiędzy wrażliwością na infekcję grzybiczą owadów a składem związków zidentyfikowanych w owadach określono wrażliwość różnych stadiów rozwojowych owadów na infekcję *C. coronatus*. Na podstawie tych badań stwierdzono, że wrażliwe na infekcje grzybicze są:

- samce *L. sericata* (śmiertelność 100%) [H3],
- samice *L. sericata* (śmiertelność 100%) [H3],
- samce *M. domestica* (śmiertelność 87%) [H5],
- samice *M. domestica* (śmiertelność 93%) [H5],
- samce *M. vomitoria* (śmiertelność 100%) [H8],
- samice *M. vomitoria* (śmiertelność 100%) [H8],
- samce *L. sericata* (śmiertelność 100%) [H14],
- samice *L. sericata* (śmiertelność 100%) [H14].

Stwierdzono również, że niewrażliwe na infekcje *C. coronatus* są:

- larwy *M. domestica* (śmiertelność 0%) [H5],
- poczwarki *M. domestica* (śmiertelność 0%) [H5],
- larwy *M. vomitoria* (śmiertelność 0%) [H8],
- poczwarki *M. vomitoria* (śmiertelność 0%) [H8],
- larwy *L. sericata* (śmiertelność 0%) [H14],
- poczwarki *L. sericata* (śmiertelność 0%) [H14].

Dzięki określeniu wrażliwości poszczególnych stadiów rozwojowych i analizom składu związków obecnych na kutykuli i wewnątrz owadów stwierdzono, że poziom wrażliwości badanych owadów na infekcję grzybem *C. coronatus* jest skorelowany z określonym składem jakościowym i ilościowym związków kutykularnych i wewnętrznych. Określono jakie związki występują tylko w danym stadium rozwojowym konkretnego gatunku owada i które z nich są dla tego stadium

charakterystyczne. Określono także różnice ilościowe związków kutykularnych poszczególnych stadiów rozwojowych owadów. Związki charakterystyczne dla danego stadium rozwojowego i różnice ilościowe zidentyfikowanych związków mają wpływ na wrażliwość owadów na infekcje grzybicze. Szczegółowe dane tych analiz przedstawiono powyżej w opisach zidentyfikowanych związków we frakcjach lipidowych owadów. Podsumowując można stwierdzić, że w kutykularnych frakcjach lipidowych owadów niewrażliwych na infekcje *C. coronatus* znajdują się związki, które posiadają właściwości przeciwgrzybicze.

## 6. Aktywność biologiczna zidentyfikowanych związków

Owady są narażone na nieustanny kontakt z mikroorganizmami, a mimo to stosunkowo rzadko ulegają infekcjom, dlatego prawdopodobnie wśród związków zawartych we frakcjach lipidowych owadów istnieją związki, które posiadają właściwości przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne [54, 55]. Z tego powodu przeprowadzono badania wpływu związków zidentyfikowanych we frakcjach lipidowych owadów, ich mieszanin oraz ekstraktów kutykularnych i wewnętrznych na grzyby (w tym entomopatogeniczne), bakterie Gram (+) i bakterie Gram (-): *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* (Tve-N39), *Beauveria bassiana* (Dv-1/07), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Aspergillus niger* ATCC, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida lipolytica* PCM 2680 i *Candida tropicalis* PCM 2681 [H5, H6, H8, H9, H11, H13, H16].

Dla pojedynczych związków zidentyfikowanych we frakcjach lipidowych owadów i ich mieszanin oraz dla ekstraktów kutykularnych i wewnętrznych owadów wyznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC). Oznaczenia wykonywane były metodą seryjnych rozcieńczeń w podłożu płynnym, według rekomendacji *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Dla kwasów tłuszczowych oraz mieszanin kwasów tłuszczowych zidentyfikowanych w wydzielinie *F. nigra* wyznaczono również strefy zahamowania wzrostu (Inhibition zone) [H6]. Do badań użyto następujące gatunki mikroorganizmów: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens*. Oznaczenia wykonywane były również według rekomendacji *Clinical Laboratory Standards Institute*.

Badano wpływ na mikroorganizmy następujących związków, ich mieszanin i ekstraktów frakcji lipidowych owadów:

- kwasy tłuszczowe: C5:0; C6:0, C7:0; C8:0; C9:0; C10:0; C11:0, C12:0; C14:0; C14:1, C15:0, C16:0; C16:1; C17:0, C17:1, C18:0; C18:1; C18:2, C18:3, C19:0, C19:1, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3, C20:4, C20:5, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0 i C26:0 [H6, H11],
- mieszaniny kwasów tłuszczowych larw *F. nigra* oraz larw, poczwarek, samców i samic *S. carnaria* [H6, H11],
- alkohole: C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0, C30:0 i C31:0 [H5, H9],
- mieszaniny alkoholi larw, poczwarek, samców i samic *M. domestica* oraz *C. vomitoria* [H5, H9],
- estry metylowe kwasów tłuszczowych: C13:0, C15:0, C15:1, C16:0, C17:0, C17:1, C18:0, C19:0, C19:1, C19:2 [H9],
- mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych wszystkich stadiów rozwojowych *C. vomitoria* [H9],
- związki nietypowe dla owadów: kwasy azelainowy, kwas sebacynowy, kwas fenyllooctowy, kwas fenylpropionowy, 2,4-dekadial, octan tokoferolu i kwas 2-metylo-2-hydroksybutanowy uracyl, ester butylowy kwasu stearynowego, monooleinian glicerolu, 9-trikozen, ester dimetylowy kwasu suberynowego [H13, H16],
- ekstrakty kutykularnych i wewnętrznych frakcji lipidowych larw, poczwarek, samców i samic *C. vomitoria* [H8].

### Kwasy tłuszczowe

Dla następujących kwasów tłuszczowych: C5:0, C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 i C18:2 wyznaczono wartości MIC w stosunku do *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39) i *B. bassiana* (Dv-1/07) [H6]. Najniższe wartości MIC uzyskano dla C7:0, C8:0, C9:0 i C10:0 w stosunku do *L. lecanii* (0,016 mg/ml) oraz dla C9:0 i C10:0 w stosunku do *B. bassiana* (Dv-1/07) (0,016 mg/ml). Wzrost *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *M. anisopliae* i *B. bassiana* (Tve-N39) hamują również kwasy C7:0, C8:0, C9:0 i C10:0 (MIC 0,032 mg/ml), natomiast kwas C12:0 hamuje wzrost *L. lecanii* (MIC 0,032 mg/ml), a kwasy C7:0, C8:0 i C12:0 hamują wzrost *B. bassiana* (Dv-1/07) (MIC 0,032 mg/ml). Wpływ kwasów C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 i C18:2 na rozwój ww. grzybów jest mniejszy (wartości MIC wynoszą od 0,256 do >1,024 mg/ml).

Analizowany był również wpływ kwasów tłuszczowych C6:0, C11:0, C12:0, C14:1, C15:0, C17:0, C17:1, C18:3, C19:0, C19:1, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3, C20:4, C20:5, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0 i C26:0 na wzrost grzybów: *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39), *B. bassiana* (Dv-1/07) oraz *C. albicans* [H11]. Stwierdzono, że kwasy C6:0,



C11:0, C13:0 i C14:1 hamują wzrost mikroorganizmów w największym stopniu. Wartości MIC dla tych związków wynoszą od 0,032 do 0,256 mg/ml. Kwas C6:0 hamuje wzrost *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus* i *B. bassiana* (Tve-N39) w stężeniu 0,064 mg/ml, natomiast *L. lecanii* i *B. bassiana* (Dv-1/07) w stężeniu 0,128 mg/ml. Kwas C11:0 hamuje wzrost wszystkich grzybów w stężeniu 0,032 mg/ml, natomiast wartości MIC kwasów C13:0 i C14:1 wynoszą od 0,032 do 0,256 mg/ml. Kwasy C18:3, C20:2, C20:3, C20:4 i C20:5 hamują wzrost w wyższych stężeniach od 0,128 do 0,512 mg/ml, a zdolność hamowania wzrostu grzybów pozostałych kwasów jest jeszcze niższa.

Dla kwasów C5:0, C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 i C18:2 wyznaczono strefy zahamowania wzrostu następujących mikroorganizmów: *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* [H6]. Większość badanych kwasów wykazuje aktywność przeciwbakteryjną. W największym stopniu wzrost mikroorganizmów hamują kwasy C8:0, C9:0 i C16:1. Średnica strefy zahamowania wzrostu wynosiła od 14 do 17 mm, a nawet do 22 mm dla kwasu C16:1. Stwierdzono brak aktywności kwasów C14:0, C16:0, C18:2 i C18:0. Stwierdzono również, że *C. freundii* jest najbardziej wrażliwa na badane związki.

### Mieszanki kwasów tłuszczowych

Analizowany był również wpływ mieszanin kwasów tłuszczowych larw *F. nigra* na wzrost grzybów *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39) i *B. bassiana* (Dv-1/07) [H6]. Na podstawie badań stwierdzono, że mieszaniny tych związków nie wpływają znacząco na wzrost grzybni. Wartości MIC dla tych mieszanin wynosiły od 0,512 do >1,024 mg/ml. Analizowano także wpływ mieszanin kwasów tłuszczowych larw, poczwerek, samców i samic *S. carnaria* na wzrost *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39), *B. bassiana* (Dv-1/07) oraz *C. albicans* [H11]. Również w tym przypadku zdolność hamowania wzrostu entomopatogenicznych grzybów przez mieszaniny kwasów tłuszczowych jest niewielka (wartości MIC wynoszą od 0,512 do >1,024 mg/ml).

Dla mieszanin kwasów wyznaczono strefy zahamowania wzrostu następujących mikroorganizmów: *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* [H6]. Wśród czterech testowanych mieszanin najbardziej skuteczną była mieszanina kwasów, której obecność stwierdzono w podłożu, na którym żyją larwy *F. nigra*. Zwłaszcza w stosunku do *B. cereus* i *E. faecalis* ta mieszanina kwasów wykazywała duże średnice strefy zahamowania wzrostu (16 i 18 mm). Żadna z badanych mieszanin kwasów nie wykazała aktywności wobec *P. fluorescens*.

### Alkohole

Dla następujących alkoholi: C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0 i C30:0 wyznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost następujących mikroorganizmów: *B. subtilis* ATCC 6633, *R. equi* ATCC 6939, *S. aureus* ATCC 25923, *A. niger* ATCC, *C. albicans* ATCC 10231, *C. lipolytica* PCM 2680 i *C. tropicalis* PCM 2681 [H5]. Najniższe wartości MIC uzyskano dla C14:0 w stosunku do *B. subtilis* ATCC 6633, *R. equi* ATCC 6939 i *S. aureus* ATCC 25923 (odpowiednio 0,064, 0,128 i 0,128 mg/ml) oraz dla C10:0 i C12:0 w stosunku do *C. tropicalis* PCM 2681 (obydwie wartości 0,512 mg/ml).

Testowany był również wpływ alkoholi C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0, C30:0 i C31:0 na wzrost entomopatogenicznych grzybów: *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39) i *B. bassiana* (Dv-1/07) [H9]. Alkohole te w niewielkim stopniu wpływają na wzrost entomopatogenicznych grzybów. Tylko alkohol C14:0 hamuje wzrost *M. anisopliae* w stężeniu 0,256 mg/ml i *B. bassiana* DV-1/107 oraz *P. fumosoroseus* w stężeniu 0,512 mg/ml. Natomiast alkohol C12:0 hamuje wzrost *B. bassiana* DV-1/107, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, i *P. lilacinus* w stężeniu 0,512 mg/ml. Również w tym stężeniu wzrost *M. anisopliae* jest hamowany przez alkohole C26:0, C28:0, C30:0. Pozostałe alkohole wykazują jeszcze mniejszy wpływ na entomopatogeniczne grzyby.

### Mieszanki alkoholi

Analizowany był wpływ mieszanin alkoholi larw, poczwerek, samców i samic *M. domestica* na *R. equi* ATCC 6939, *A. niger* ATCC, *C. albicans* ATCC 10231, *C. lipolytica* PCM 2680 i *C. tropicalis* PCM 2681 [H5]. Spośród mieszanin alkoholi wszystkich stadiów rozwojowych *M. domestica*, alkohole larw wykazują najniższe stężenie hamujące wzrost *R. equi* (0,256 mg/ml). Wzrost *R. equi* ATCC 6939 hamuje również mieszanina alkoholi samic *M. domestica* (MIC 0,512 mg/ml). Wzrost *C. tropicalis* PCM 2681 hamują mieszaniny alkoholi samców i larw *M. domestica* (MIC 0,512 mg/ml), natomiast wzrost *C. lipolytica* PCM 2680 hamują mieszaniny alkoholi samców, samic i larw (MIC 0,512 mg/ml).

Testowany był również wpływ mieszanin alkoholi *C. vomitoria* na wzrost entomopatogenicznych grzybów: *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39) i *B. bassiana* (Dv-1/07) [H9]. Mieszanki alkoholi w niewielkim stopniu wpływają na wzrost entomopatogenicznych grzybów:

- *B. bassiana* DV-1/107 jest najbardziej wrażliwa na mieszaninę kutykularnych alkoholi larw i poczwerek (MIC 0,512 mg/ml),
- *M. anisopliae* jest najbardziej wrażliwy na mieszaninę kutykularnych alkoholi larw i samców (MIC 0,512 mg/ml),

- *P. fumosoroseus* jest najbardziej wrażliwy na mieszaninę kutykularnych alkoholi samców (MIC 0,512 mg/ml),
- *P. lilacinus* jest najbardziej wrażliwy na mieszaninę kutykularnych alkoholi larw (MIC 0,512 mg/ml).

### **Estry metylowe kwasów tłuszczowych**

Analizowano wpływ następujących estrów metylowych kwasów tłuszczowych: C13:0, C15:0, C15:1, C16:0, C17:0, C17:1, C18:0, C19:0, C19:1, C19:2, C19:3 na wzrost grzybów: *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39) i *B. bassiana* (Dv-1/07) [H9]. Na podstawie badań stwierdzono, że analizowane estry metylowe posiadają niewielką aktywność wobec testowanych grzybów owadobójczych.

### **Mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych**

Mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych, zarówno kutykularnych, jak i wewnętrznych wszystkich stadiów rozwojowych *C. vomitoria* hamują wzrost entomopatogenicznych grzybów (*B. bassiana* DV-1/107, *B. bassiana* (Tve-N39), *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*) w nieco niższych stężeniach niż poszczególne estry metylowe (MIC od 0,512 do 1,024 mg/ml) [H9].

### **Związki nienależące do podstawowych grup lipidów owadów**

Dla nietypowych dla owadów związków (kwas azelainowy, kwas sebacynowy, kwas fenylooctowy, kwas fenylopropionowy, 2,4-dekadienal, octan tokoferolu, kwas 2-metylo-2-hydroksybutanowy [H13], uracyl, ester butylowy kwasu stearynowego, monooleinian glicerolu, 9-trikozen, ester dimetylowy kwasu suberynowego [H16]) wyznaczono wartości MIC wobec następujących mikroorganizmów: *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39), *B. bassiana* (Dv-1/07), *B. subtilis* ATCC 6633, *E. faecalis*, *R. equi* ATCC 6939, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis*, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13882, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* ATCC 13315, *P. aeruginosa*, *C. albicans* ATCC 10231 i *C. tropicalis* PCM 2681. Stwierdzono, że kwasy azelainowy i sebacynowy nie hamują wzrostu żadnego z analizowanych mikroorganizmów. Kwas fenylooctowy hamuje wzrost tylko entomopatogenicznych grzybów (MIC od 0,128 do 0,512 mg/ml; wyjątek stanowi *P. lilacinus* dla którego MIC wynosi 1,024 mg/ml). Podobnie działa kwas fenylopropionowy - hamuje wzrost tylko entomopatogenicznych grzybów (MIC 0,128 mg/ml; z wyjątkiem *P. lilacinus* dla którego MIC

wynosi 0,256 mg/ml). Kwas 2-metylo-2-hydroksybutanowy wykazuje działanie tylko w stosunku do *L. lecanii* (0,512 mg/ml), *M. anisopliae* (0,256 mg/ml), *P. fumosoroseus* (0,512 mg/ml) i *P. lilacinus* (0,256 mg/ml). 2,4-Dekadienal hamuje wzrost *B. subtilis* (0,064 mg/ml), *E. faecalis* (0,128 mg/ml), *R. equi* (0,064 mg/ml), *S. aureus* (0,064 mg/ml), *S. epidermidis* (0,064 mg/ml) oraz w wyższych stężeniach entomopatogenicznych grzybów: *B. bassiana* DV-1/107 (0,512 mg/ml), *B. bassiana* (Tve-N39) (0,256 mg/ml), *L. lecanii* (0,256 mg/ml), *M. anisopliae* (0,512 mg/ml), *P. fumosoroseus* (0,512 mg/ml) i *P. lilacinus* (0,512 mg/ml). Octan tokoferolu działa w dużych stężeniach tylko na entomopatogeniczne grzyby (najniższa wartość MIC wynosi 0,256 mg/ml w stosunku do *L. lecanii*). Uracyl, ester butylowy kwasu stearynowego, monooleinian glicerolu, 9-trikozen, ester dimetylowy kwasu suberynowego tylko niewielkim stopniu hamują wzrost entomopatogenicznych grzybów [H16]. Poniżej przedstawiono wyniki tylko dla związków, które hamują wzrost mikroorganizmów w najniższych stężeniach. Uracyl hamuje wzrost *B. bassiana* (Tve-N39) w stężeniu 0,256 mg/ml, natomiast wzrost *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* i *B. bassiana* (Dv-1/07) jest hamowany w stężeniu 0,512 mg/ml. Ester dimetylowy kwasu suberynowego hamuje wzrost wszystkich analizowanych grzybów w stężeniu 0,512 mg/ml. Pozostałe związki (ester butylowy kwasu stearynowego, monooleinian glicerolu i 9-trikozen) nie wykazują właściwości przeciwgrzybiczych.

### **Fracje lipidowe hamujące wzrost mikroorganizmów**

Analizowano wpływ kutykularnych i wewnętrznych frakcji lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *C. vomitoria* na wzrost *R. equi*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis* i *A. niger* [H8]. Poniżej przedstawiono wyniki analiz frakcji lipidowych, które hamują wzrost mikroorganizmów w najniższych stężeniach. Spośród ekstraktów wszystkich stadiów rozwojowych *C. vomitoria* wewnętrzne frakcje lipidowe samców wykazują najniższe stężenie hamujące wzrost *R. equi* i *B. subtilis* (0,256 mg/ml) oraz *S. aureus* (0,512 mg/ml). Minimalne stężenie wewnętrznych frakcji lipidowych samic hamujące wzrost *R. equi*, *B. subtilis* oraz *S. aureus* wynosi 0,512 mg/ml. Również wewnętrzne frakcje lipidowe larw wykazują działanie w stężeniu 0,512 mg/ml w stosunku do *R. equi* i *S. aureus*. Ekstrakty kutykularne wszystkich stadiów rozwojowych i wewnętrzne frakcje lipidowe poczwerek *C. vomitoria* wykazują znacznie słabsze działanie hamujące wzrost wszystkich analizowanych mikroorganizmów (*R. equi*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *A. niger*). Żaden z ekstraktów kutykularnych

i wewnętrznych nie hamuje wzrostu *C. albicans*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis* i *A. niger* (MIC 2,048 mg/ml).

## 7. Przegląd literatury, podsumowanie badań chemicznych i biologicznych

Dzięki przeprowadzonym badaniom chemicznym i biologicznym oraz opracowaniu dostępnej literatury dotyczącej podjętego tematu przygotowano materiały podsumowujące, opublikowane jako artykuły przeglądowe [H2], [H12]. W publikacji [H2] opisano składy i rolę kutykularnych frakcji lipidowych wybranych gatunków owadów, metody określania wrażliwości owadów na infekcje grzybicze, metody badania wpływu kwasów tłuszczowych na wzrost i patogeniczność entomopatogenicznych grzybów, metody analiz składu kutykularnych frakcji lipidowych owadów (w tym metody ekstrakcji, SPME (Solid-Phase Microextraction), SI (Solid Injection), chromatografię kolumnową, HPLC, TLC i GC/MS) oraz metody otrzymywania pochodnych do analiz chromatograficznych. W publikacji [H12] opisano biologiczne metody kontrolowania szkodliwych owadów, składy frakcji lipidowych wybranych gatunków owadów oraz zastosowanie technik chromatograficznych używanych do analiz związków pochodzenia owadziego: chromatografię cieczową, chromatografię gazową i techniki łączone.

### Podsumowanie

W czternastu oryginalnych pracach określono skład ilościowy i jakościowy frakcji lipidowych ośmiu gatunków owadów (*M. domestica*, *C. vomitoria*, *C. vicina*, *L. sericata*, *S. carnaria*, *D. pini*, *F. nigra* i *Z. atratus*) oraz badano wpływ zidentyfikowanych związków na wzrost grzybów i bakterii. W dwóch pracach przeglądowych opisano metody analiz związków obecnych we frakcjach lipidowych jako potencjalnych biofungicydów oraz zastosowanie technik chromatograficznych do rozdzielania i identyfikacji związków owadzich.

Podczas analiz w większości przypadków wykonano trójstopniową ekstrakcję związków obecnych na kutykuli i wewnątrz owadów. Jedynie podczas ekstrakcji frakcji lipidowej z wylinek *D. pini*, z całych owadów *F. nigra* i z ciała tłuszczowego *Z. atratus* zastosowano pojedynczą lub dwukrotną ekstrakcję. Otrzymane ekstrakty frakcji lipidowych rozdzielono na grupy związków (HPLC-LLSD). Następnie określono skład jakościowy i ilościowy związków obecnych na powierzchni i wewnątrz analizowanych gatunków owadów za pomocą technik GC i GC/MS.

W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych owadów zidentyfikowano kwasy tłuszczowe, alkohole, n-alkany, estry, sterole oraz 19 związków nietypowych dla owadów. Kwasy tłuszczowe są główną grupą związków frakcji lipidowych owadów. Związki te były zidentyfikowane w larwach *F. nigra*, w larwach i poczwarkach *D. pini*, *C. vicina* i *Z. atratus* oraz w larwach,

poczwarkach, samcach i samicach *L. sericata*, *C. vomitoria* oraz *S. canaria*. W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych analizowanych gatunków owadów występują kwasy nasycone i nienasycone, zarówno o parzystej, jak i nieparzystej liczbie atomów węgla. Związków o parzystej liczbie atomów węgla jest zazwyczaj dużo więcej niż kwasów o nieparzystej liczbie, a w największej ilości w analizowanych gatunkach owadów występowały: C14:0, C16:1, C16:0, C18:1 i C18:0. Przykładowo, na powierzchni kutykuli samic *L. sericata* obecnych jest 16 kwasów od C6:0 do C26:0. Jedynie frakcja lipidowa wylinek *D. pini* posiada inny profil kwasów tłuszczowych. W wylinkach larwalno-larwalnych i larwalno-poczwarkowych zidentyfikowano odpowiednio 27 i 26 nasyconych kwasów od C8:0 do C34:0. Wszystkie zidentyfikowane kwasy są nasycone, a w największych ilościach zidentyfikowane były C20:0, C22:0, C26:0, C28:0, C30:0 i C32:0. Do nietypowych kwasów tłuszczowych analizowanych gatunków owadów można zaliczyć związki o nieparzystej liczbie atomów węgla, np. C7:0, C9:0, C11:0, C15:0 i C17:0 oraz nienasycony kwas o nieparzystej liczbie atomów węgla C17:1 występujący wewnątrz samic *L. sericata*. Również nietypowe są nienasycone kwasy tłuszczowe o 20 atomach węgla. Przykładowo, takie związki zawierające 4 i 5 miejsc nienasycenia zidentyfikowano we frakcjach lipidowych *L. sericata*. Może to być cecha charakterystyczna muchówek, ponieważ w innych gatunkach owadów nie zidentyfikowano tych związków.

Alkohole były zidentyfikowane w ekstraktach larw i poczwerek *Z. atratus* oraz we frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *L. sericata*, *M. domestica* i *C. vomitoria*. Wszystkie zidentyfikowane alkohole posiadają parzystą liczbę atomów węgla i są nasycone. Przykładowo, w kutykularnych frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *L. sericata* zidentyfikowano odpowiednio 4, 9, 5 i 7 alkoholi od C10:0 do C28:0. W największych ilościach występują C16:0 w ekstraktach larw, C24:0 we frakcjach lipidowych poczwerek oraz C18:0 we frakcjach lipidowych samców i samic. Alkohole wewnętrzne występują tylko we frakcjach lipidowych samców i samic *L. sericata* w śladowych ilościach. W ciele tłuszczowym larw i poczwerek *Z. atratus* stwierdzono obecność tylko 5 alkoholi. W największych ilościach występował alkohol C10:0 i stanowił on 91,7% alkoholi w ciele tłuszczowym larw kontrolnych oraz 67,5% w ciele tłuszczowym larw po 48 godzinach od wstrzyknięcia hormonu AKH. W ciele tłuszczowym kontrolnych poczwerek alkohol C10:0 stanowił 79,2% oraz 83,2% w ciele tłuszczowym poczwerek po 24 godzinach od wstrzyknięcia hormonu AKH.

We frakcjach lipidowych larw, poczwerek, samców i samic *L. sericata* zidentyfikowano n-alkany. Na powierzchni kutykuli larw zidentyfikowano 7 n-alkanów do C23 do C31, natomiast we frakcjach poczwerek, samców i samic zidentyfikowano znacznie więcej n-alkanów, odpowiednio 18, 17 i 16 do C12 do C31. W larwach i poczwarkach dominują C27, C29 i C31, a w samcach

i samicach C23, C25 i C27. We wnętrzu larw, poczwarek, samców i samic *L. sericata* zidentyfikowano odpowiednio 5, 7, 5 i 4 n-alkany zawierające od 23 do 31 atomów węgla. Zarówno w kutykularnych frakcjach lipidowych, jak i wewnętrznych dominują n-alkany o nieparzystej liczbie atomów węgla.

Estry metylowe kwasów tłuszczowych zostały zidentyfikowane w ciele tłuszczowym larw i poczwarek *Z. atratus* oraz na powierzchni i wewnątrz larw, poczwarek, samców i samic *C. vomitoria*. Na powierzchni kutykuli larw, poczwarek, samców i samic *C. vomitoria* zidentyfikowano odpowiednio 6, 7, 5 i 7 estrów, a wewnątrz odpowiednio 9, 10, 6 i 7 estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Zidentyfikowano nasycone i nienasycone estry zawierające zarówno parzystą, jak i nieparzystą liczbę atomów węgla, choć estrów o nieparzystej liczbie atomów węgla jest więcej i występują w większych ilościach. Głównymi estrami larw, poczwarek, samców i samic *C. vomitoria* są C17:1 i C19:1. W ciele tłuszczowym larw i poczwarek *Z. atratus* zidentyfikowano 15 estrów metylowych, a w największej ilości występują następujące estry metylowe kwasów: C16:0, C18:2, C18:1 i C18:0.

Cholesterol występuje na powierzchni kutykuli i wewnątrz następujących gatunków owadów: *M. domestica*, *L. sericata*, *C. vicina*, *C. vomitoria*, *S. canaria* i *Z. atratus*. Spośród analizowanych gatunków zawartość kutykularnego cholesterolu samic *S. canaria* jest najwyższa. W analizowanych gatunkach owadów zawartość cholesterolu wewnętrznego jest znacznie wyższa niż kutykularnego. Najwyższą jego zawartość stwierdzono w larwach, poczwarkach, samcach i samicach *L. sericata*. Oprócz cholesterolu inne sterole były identyfikowane w larwach *M. domestica* oraz w larwach i poczwarkach *Z. atratus*. W kutykularnych i wewnętrznych frakcjach lipidowych larw, poczwarek, samców i samic *M. domestica* zidentyfikowano 7 steroli: cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, sitosterol, sitostanol i fukosterol (zidentyfikowany tylko w larwach). Na powierzchni kutykuli larw i poczwarek *M. domestica* w największej ilości występował sitosterol (odpowiednio 74,0% i 57,9%), a na powierzchni samców i samic w największej ilości występował cholesterol (odpowiednio 79,9% i 76,3%). Wewnątrz larw, poczwarek, samców i samic *M. domestica* w największej ilości występował cholesterol (odpowiednio 54,7%, 57,4%, 73,2% i 75,1%). W ciele tłuszczowym larw i poczwarek *Z. atratus* zidentyfikowano tylko 2 sterole: cholesterol i sitosterol. Po wstrzyknięciu hormonu AKH larwom, po 24 godzinach zawartość cholesterolu wzrosła, a po 48 godzinach zmalała, natomiast zawartość cholesterolu w poczwarkach maleje zarówno po 24, jak i po 48 godzinach.

We frakcjach lipidowych zidentyfikowano 19 związków nietypowych dla owadów: kwas dehydroabietynowy, kwas azelainowy, kwas sebacynowy, kwas 2-metylo-2-hydroksybutanowy, kwas fenylooctowy, kwas fenylopropionowy, 2,4-dekadienal, octan tokoferolu, uracyl, 9-trikozen,

monoolefin glicerolu, ester dimetylowy kwasu suberynowego, ester butylowy kwasu stearynowego, ester decylowy kwasu oktanowego, ester etylowy kwasu heksadekanowego, ester etylowy kwasu oktadekanowego, ester decylowy kwasu oktanowego, ester etylowy kwasu oktadekanowego i ester tetradecylowy kwasu oktanowego. Funkcje tych związków pozostają w większości nieznane, jednak spośród nich 9-trikozen jest znanym feromonem owadów, a niektóre z tych związków wykazują właściwości przeciwgrzybicze.

W celu stwierdzenia w jakich stadiach rozwojowych owadów mogą znajdować się związki o właściwościach przeciwgrzybiczych lub przeciwbakteryjnych określono wrażliwość różnych stadiów rozwojowych siedmiu gatunków owadów na infekcję *C. coronatus* i stwierdzono, że niewrażliwe są: larwy i poczwarki *M. domestica*, *M. vomitoria* i *L. sericata*. Przeprowadzono również badania wpływu związków owadzych na grzyby (w tym entomopatogeniczne), bakterie Gram (+) i bakterie Gram (-). W tym celu wyznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost mikroorganizmów pod wpływem: kwasów tłuszczowych, alkoholi, estrów metylowych kwasów tłuszczowych, związków nietypowych dla owadów, ekstraktów frakcji lipidowych oraz mieszanin kwasów tłuszczowych, alkoholi i estrów metylowych. Wyznaczono również strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów pod wpływem kwasów tłuszczowych. Najniższe wartości MIC uzyskano dla kwasów tłuszczowych C7:0, C8:0, C9:0 i C10:0 w stosunku do *L. lecanii* (0,016 mg/ml) oraz dla C9:0 i C10:0 w stosunku do *B. bassiana* (Dv-1/07) (0,016 mg/ml). Wzrost *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *M. anisopliae* i *B. bassiana* (Tve-N39) hamują również kwasy C7:0, C8:0, C9:0 i C10:0 (MIC 0,032 mg/ml), natomiast kwas C12:0 hamuje wzrost *L. lecanii* (MIC 0,032 mg/ml), a kwasy C7:0, C8:0 i C12:0 hamują wzrost *B. bassiana* (Dv-1/07) (MIC 0,032 mg/ml). Kwas C11:0 hamuje wzrost *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*, *M. anisopliae*, *B. bassiana* (Tve-N39), *B. bassiana* (Dv-1/07) oraz *C. albicans* w stężeniu 0,032 mg/ml. Największy wpływ przeciwbakteryjny stwierdzono dla kwasów C8:0, C9:0 i C16:1. Średnica strefy zahamowania wzrostu wynosiła od 14 do 17 mm, a nawet do 22 mm dla kwasu C16:1. Analizowany był również wpływ mieszanin kwasów tłuszczowych larw *F. nigra* oraz larw, poczwarek, samców i samic *S. carnaria*. Na podstawie badań stwierdzono, że mieszaniny tych związków nie wpływają znacząco na wzrost grzybni. Kolejne badania wykazały, że alkohole i ich mieszaniny nie posiadają silnych właściwości przeciwgrzybiczych. Najniższe wartości MIC uzyskano dla alkoholu C14:0 w stosunku do *B. subtilis* ATCC 6633, *R. equi* ATCC 6939 i *S. aureus* ATCC 25923 (odpowiednio 0,064, 0,128 i 0,128 mg/ml), natomiast alkohol C14:0 hamuje wzrost *M. anisopliae* w stężeniu 0,256 mg/ml i *B. bassiana* DV-1/107 oraz *P. fumosoroseus* w stężeniu 0,512 mg/ml. Estrы metylowe kwasów tłuszczowych i ich mieszaniny również nie wykazują właściwości przeciwgrzybiczych. Spośród nietypowych związków dla owadów największe właściwości przeciwgrzybicze wykazuje



2,4-dekadienal, który hamuje wzrost *B. subtilis* (0,064 mg/ml), *E. faecalis* (0,128 mg/ml), *R. equi* (0,064 mg/ml), *S. aureus* (0,064 mg/ml) i *S. epidermidis* (0,064 mg/ml).

Podsumowując można stwierdzić, że zastosowane techniki analityczne przygotowania próbek, a także analizy jakościowej i ilościowej związków pochodzenia owadziego oraz analizy dotyczące właściwości biologicznych zidentyfikowanych związków są odpowiednie do tego typu badań. Pozwalają one na zidentyfikowanie całego spektrum związków o różnej polarności oraz określenie ich właściwości przeciwwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych. Niniejsze osiągnięcie oprócz aspektów poznawczych z dziedziny patologii owadów może mieć w przyszłości również znaczenie praktyczne dzięki wykorzystaniu związków owadzych jako bioinsektycydy lub jako środki przeciwwgrzybicze czy ewentualnie przeciwbakteryjne.

## 8. Literatura

1. Hadley, N.F., Water relations of terrestrial arthropods. Academic Press, San Diego (1994).
2. Gibbs A.G., Louie A.K., Ayala J. A., *J. Exp. Biol.* 210 (1998) 71-80.
3. St. Leger R., Integument as a barrier to microbial infections. W: Binnington K., Retnakaran A. (ed.) *Physiology of the insect epidermis*. CSIRO, Australia, (1991) 284–306
4. Lockey K.H., *Comp. Biochem. Physiol.* 89B (1988) 595-645.
5. Howard R.W., Cuticular hydrocarbons and chemical communication. W: Stanley-Samuelson, D.W., Nelson D.R. (ed.), *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. University of Nebraska Press, Lincoln (1993) 179-226.
6. Singer T.L., *Am. Zool.* 38 (1998) 394-405.
7. Nelson D.R., Blomquist J.G., Insect waxes. W: Hamilton R.J. (ed.), *Waxes: chemistry, Molecular biology and functions*. The Oily Press Ltd., Dundee, Scotland. (1995) 1-90.
8. Buckner J.S., Mardaus M.C., Nelson D.R., *Comp. Biochem. Physiol.* 114B (1996) 207–216.
9. Nelson D.R., Guershon M., Gerling D., *Comp. Biochem. Physiol.* 119B (1998) 655–665.
10. Mardaus M.C., Buckner J.S., *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (1997) 551–561.
11. Nelson D.R., Lee R.E. Jr., *Comp. Biochem. Physiol.* 138B (2004) 313–320.
12. Soliday C.L., Blomquist G.J., Jackson L.L., *J. Lipid Res.* 15 (1974) 399–405.
13. Buckner J.S., Hagen M.M., Nelson D.R., *Comp. Biochem. Physiol.* 124B (1999) 201–207.
14. Nelson D.R., Tissot M., Nelson L.J., Fatland C.L., Gordon D.M., *Comp. Biochem. Physiol.* 128B (2001) 575–595.
15. Nelson D.R., Charlet L.D., *Comp. Biochem. Physiol.* 135B (2003) 273–284.
16. Kofronová E., Cvacka J., Vrkošlav V., Hanus R., Jiros P., Kindl J., Hovorka O., Valterová I., *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3878–3884.
17. Byrdwell W.C., *Modern methods for lipid analysis by liquid chromatography/mass spectrometry and related techniques* AOCS, Champaign (2005).
18. Kofronová E., Cvacka J., Jiros P., Sykora D., Valterová J., *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 111 (2009) 519–525.
19. Buckner J.S., Mardaus M.C., Nelson D.R., *Comp. Biochem. Physiol.* 114B (1996) 207–216.
20. Baker J.E., Sukkestad D.R., Nelson D.R., Fatland C.L., *Insect Biochem.* 9 (1979) 603–611.
21. Oraha V.S., Lockey K.H., *Comp. Biochem. Physiol.* 95B (1990) 603–608.
22. Baker J.E., *Insect Biochem.* 8 (1978) 287–292.
23. Howard R.W., Lord J.C., *J. Chem. Ecol.* 29 (2003) 615–627.
24. Baker J.E., *Insect Biochem.* 9 (1979) 335–339.
25. Blomquist G.J., Chu A.J., Remaley S., *Insect Biochem.* 10 (1980) 313–321.

26. Gołębiowski M., Maliński E., Boguś M.I., Kumirska J., Stepnowski P., *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38 (2008) 619–627.
27. Brey P.T., Ohayon Lesourd M., Castex H., Roucache J., Latge J.P., *Comp. Biochem. Physiol.* 82A (1985) 401–411.
28. Kerwin J.L., *Can. J. Microbiol.* 30 (1984) 158–161.
29. Soliday C.L., Blomquist G.J., Jackson L.L., *J. Lipid Res.* 15 (1974) 399–405.
30. Buckner J.S., Cuticular polar lipids of insects. W: Stanley-Samuelson, D.W., Nelson, D.R. (ed.), *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. University of Nebraska Press, Lincoln (1993) 227–270.
31. Jones T.H., Moran M.D., Hurd L.E., *Comp. Biochem. Physiol.* 116B (1997) 419–422.
32. Buckner J.S., Nelson D.R., Mardaus M.C., *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24 (1994) 977–987.
33. Akino T., Yamamura K., Wakamura S., Yamaoka R., *Appl. Entomol. Zool.* 39 (2004) 381–387.
34. Augustynowicz M., Maliński E., Warnke Z., Szafranek J., Nawrot J., *Comp. Biochem. Physiol.* 86B (1987) 519–523.
35. Smith A.A., Holldober B., Liebig J., *Curr. Biol.* 19 (2009) 78–81.
36. Nelson D.R., Leopold R.A., *Comp. Biochem. Physiol.* 136B (2003) 295–308.
37. Nelson D.R., Olson D.L., Fatland Ch.L., *Comp. Biochem. Physiol.* 133B (2002) 337–350.
38. Nelson D.R., Adams T.S., Fatland Ch.L., *Comp. Biochem. Physiol.* 134B (2003) 447–466.
39. Green P.W.C., *J. Chem. Ecol.* 35 (2009) 1096–1107.
40. Green P.W.C., *J. Stored Prod. Res.* 47 (2011) 262–266.
41. Dani F.R., Cannoni S., Turillazzi S., Morgan E.D., *J. Chem. Ecol.* 22 (1996) 37–48.
42. Le Conte Y., Arnold G., Trouiller J., Masson C., *Naturwissenschaften* 77 (1990) 334–336.
43. Svoboda J.A., Feldlaufer M.F., *Lipids* 26 (1991) 614–618.
44. Ikekawa N., *Experientia* 39 (1983) 466–472.
45. Janson E.M., Grebenok R.J., Behmer S.T., Abbot P., *J. Chem. Ecol.* 35 (2009) 1309–1319.
46. Boroczky K., Park K.C., Minard R.D., Jones T.H., Baker T.C., Tumlinson J.H., *J. Insect Physiol.* 54 (2008) 1385–1391.
47. Juarez M. P., Brenner R. R., Gros E. G., *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B (1984) 427–431.
48. Ikekawa N., Morisaki M., Fujimoto Y., *Acc. Chem. Res.* 26 (1993) 139–146.
49. La-France D., Shani A., Margalit J., *J. Chem. Ecol.* 15 (1989) 1475–1490.
50. Ruther J., Sieben S., Schrickler B., *Naturwissenschaften* 89 (2002) 111–114.
51. Kumar K.A., Setty S.R., Narsu L., *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 1 (2010) 324–337.
52. Miyazawa M., Kameoka H., *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 3153–3154.
53. De Rosa S., Kamenarska Z., Bankova V., Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva S., Najdenski H., i inni., *Z. Naturforsch.* 56C (2001) 1008–1014.
54. Khachatourians G.G., *Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi*. W: Howard, D.H., Miller, J.D. (ed.), *The Mycota VI*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1996) 331–363.
55. Koidsumi K., *J. Insect Physiol.* 1 (1957) 40–51.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze można podzielić na następujące grupy tematyczne:

- **Analiza jakościowa i ilościowa oraz aktywność biologiczna związków pochodzenia owadziego i grzybiczego:**

Identyfikacja i analiza ilościowa składu związków kutykularnych *Frankliniella occidentalis* [U1], *Blatta orientalis* i *Blattella germanica* [U38] oraz *Acanthoscelides obtectus* (Say) [U10];

Analiza składu kutykularnych kwasów tłuszczowych występujących w kutykuli larw *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* i *Galleria mellonella* oraz określenie wpływu tych kwasów na oporność owadów na infekcję grzybiczą [U4]; Określanie wpływu kwasów tłuszczowych na wzrost i patogeniczność entomopatogenicznych grzybów [U21, U35]; Określanie wpływu wydzieliny wytwarzanej przez kuczmany na wzrost mikroorganizmów [U39]; Zastosowanie technik chromatograficznych [U36] i metod jakościowych i ilościowych [U33] w analizie związków pochodzenia owadziego; Wstępna identyfikacja alkoholi [U34] i innych związków o potencjalnej aktywności biologicznej [U37] we frakcjach lipidowych owadów; Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy metabolitów wtórnych entomopatogenicznych grzybów [40]; Wpływ hormonu AKH na metabolizm larw i poczwarek *Zophobas atratus* [U44];

➤ **Analiza jakościowa i ilościowa oraz aktywność biologiczna związków pochodzenia roślinnego:**

Identyfikacja i analiza ilościowa składu olejków eterycznych dostępnych komercyjnie: imbirowego, miętowego i z pąków czarnej porzeczki [U12] oraz eukaliptusowego, sosnowego, ylang-ylang i jałowcowego [U16]; Określenie zawartości katechiny i epikatechiny w skórcie jabłek odpornych i nieodpornych na parcha jabłoniowego [U23]; Analiza jakościowa i ilościowa metabolitów wtórnych obecnych w pędach lub korzeniach rośliny *Ruta graveolens* L. po poddaniu jej działaniu elicytora biotycznego (*Agrobacterium rhizogenes* [U15], *Pectobacterium atrosepticum* i *Bacillus* sp. [U5]); Zastosowanie metody Simplex do analizy kumaryn i furanokumaryn techniką LC [U7]; Analiza kutykularnych wosków bakłazana [U14], *Solanum macrocarpon* L. [U27] i wierzby [U11]; Zastosowanie HS-SPME/GC do analizy jakościowej i ilościowej terpenów w igłach jałowca [U17]; Analiza aktywności biologicznej  $\alpha$ -amyryny [U29]; Analiza składu i aktywności biologicznej ekstraktów z *Rhaponticum carthamoides* [U45]. Zastosowanie HPLC w analizie związków roślinnych [U25]; Zastosowanie technik chromatograficznych w analizie związków pochodzenia roślinnego i owadziego [U32]; Badanie wpływu wosków powierzchniowych ziemniaka na zachowanie stonki ziemniaczanej [U51].

➤ **Analiza jakościowa i ilościowa związków pochodzenia zwierzęcego:**

Identyfikacja lipidów pasożytniczych nicieni *Anisakis simplex* i dorsza *Gadus morhua* [U20]; Analiza porównawcza składu kwasów tłuszczowych i steroli w lipidach krewetek i śledzi [U28]; Identyfikacja lipidów krewetek złowionych w Bałtyku [U41]; Porównanie składu lipidów krewetek złowionych wiosną i zimą [U43]; Analiza składu lipidów krewetek w cyklu rocznym [U47];

➤ **Analiza zanieczyszczeń środowiska**

Opracowanie metody analizy perfluorowanych kwasów karboksylowych z wykorzystaniem technik GC i GC/MS [U26]; Opracowanie metodyki oznaczania lotnych kwasów tłuszczowych w wodzie powierzchniowej [U8]; Badanie mechanizmów sorpcji cieczy jonowych [U2]; Zastosowanie trimetylosilylodiazometanu (TMSD) do otrzymywania pochodnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych [U22]; Identyfikacja produktów rozpadu cieczy jonowych w procesach oczyszczania ścieków [U3, U13, U18]; Zastosowanie metody Fentona do degradacji cieczy jonowych [U19]; Określenie parametrów fizykochemicznych do oceny wpływu na środowisko wybranych cieczy jonowych [U30]; Zastosowanie procesów utleniania do usuwania cieczy jonowych z wody [31]; Ocena wpływu cieczy jonowych na linie komórkowe i aktywność enzymatyczną [U9]; Identyfikacja lotnych składników ścieków z instalacji oksydacji asfaltów [U24]; Analiza zawartości rtęci w glebie [U49] i osadach dennych [U50].

➤ **Badania strukturalne układów polisacharydowych**

Określenie struktury chemicznej produktów degradacji O-polisacharydów (OPS) *Salmonella* Dakar [U6]; Analiza struktury O-polisacharydów *Salmonella* Uccle [U42];

➤ **Zastosowanie technik spektroskopowych**

Analiza składu chemicznego historycznych materiałów artystycznych z Muzeum Narodowego w Krakowie [U46]. Analiza zawartości polonu w tytoniu rosnącym w Polsce [48].

## 6. Publikacje uzupełniające

### 2007

- U1. **M. Gołębiowski**, E. Maliński, J. Nawrot, J. Szafranek, P. Stepnowski, (2007) Identification of the cuticular lipid composition of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 147, 288-292. **IF<sub>2007</sub>=1,651**
- U2. W. Mrozik, J. Nichthausser, A. Markowska, **M. Gołębiowski**, J. Kumirska, M. Czerwicka, E. Maliński, P. Stepnowski, (2007) Investigation of sorption mechanism of ionic liquids onto selected natural soils. *Proc. 10th CEST, Lekkas T.D., Ed., Global-NEST Vol. B.* 534–537.
- U3. M. Czerwicka, W. Mrozik, A. Müller, **M. Gołębiowski**, J. Kumirska, E. Maliński, P. Stepnowski, (2007) Study on degradation products of imidazolium ionic liquids in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV oxidation system. *Proc. 10th CEST, Lekkas T.D., Ed., Global-NEST Vol. A.* 281–286.

### 2008

- U4. **M. Gołębiowski**, E. Maliński, M.I. Boguś, J. Kumirska, P. Stepnowski, (2008) The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 619–627. **IF<sub>2008</sub>=2,626**

- U5. A. Orlita, M. Sidwa-Gorycka, E. Malinski, M. Czerwicka, J. Kumirska, **M. Gołębiowski**, E. Łojkowska, P. Stepnowski, (2008) Effective biotic elicitation of *Ruta graveolens* L. shoot cultures by lysates from *Pectobacterium atrosepticum* and *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 30, 541–545. **IF<sub>2008</sub>=1,595**
- U6. J. Kumirska, J. Szafranek, M. Czerwicka, **M. Gołębiowski**, M. Paszkiewicz, H. Dziadziuszko, D. Kunikowska, P. Stepnowski, (2008) Smith degradation of the O-antigenic polysaccharide of *Salmonella* Dakar: structural studies of the products, *Carbohydrate Research*, 343, 1120–1125. **IF<sub>2008</sub>=1,960**
- U7. M. Paszkiewicz, A. Orlita, A. Dziabas, **M. Gołębiowski**, E. Łojkowska, J. Szafranek, E. Maliński, P. Stepnowski, (2008) Simplex optimized LC analysis of plant coumarins and furanocoumarins. *Chromatographia*, 67, 653–657. **IF<sub>2008</sub>=1,312**
- U8. E.M. Siedlecka, J. Kumirska, T. Ossowski, P. Glamowski, **M. Gołębiowski**, J. Gajdus, Z. Kaczyński, P. Stepnowski, (2008) Determination of volatile fatty acids in environmental aqueous samales. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17, 351-356. **IF<sub>2008</sub>=0,963**
- U9. M. Stasiewicz, E. Mulkiwicz, R. Tomczak-Wandzel, J. Kumirska, E. M. Siedlecka, **M. Gołębiowski**, J. Gajdus, M. Czerwicka, P. Stepnowski, (2008) Assessing toxicity and biodegradation of novel, environmentally benign ionic liquids (1-alkoxymethyl-3-hydroxypyridinium chloride, saccharinate and acesulfamates) on cellular and molecular level. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 157–165. **IF<sub>2008</sub>=2,590**
- U10. **M. Gołębiowski**, E. Maliński, J. Nawrot, P. Stepnowski, (2008) Identification and characterization of surface lipid components of the dried-bean beetle *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae), *Journal of Stored Products Research*, 44, 386-388. **IF<sub>2008</sub>=0,879**
- U11. B. Szafranek, D. Tomaszewski, K. Pokrzywińska, **M. Gołębiowski**, (2008) Microstructure and chemical composition of leaf cuticular waxes in two *salix* species and their hybrid. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 50/2, 49-54. **IF<sub>2008</sub>=0,351**
- U12. **M. Gołębiowski**, B. Ostrowski, M. Paszkiewicz, Czerwicka M., Kumirska J., Haliński Ł., Maliński E., P. Stepnowski, (2008) Chemical composition of commercially available essential oils from blackcurrant, ginger, and peppermint. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 794-796. **IF<sub>2008</sub>=0,468**
- U13. E.M. Siedlecka, **M. Gołębiowski**, J. Kumirska, P. Stepnowski, (2008) Identification of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride degradation products formed in Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation system. *Analytical Chemistry (Chemia Analityczna)*, 53, 943-951. **IF<sub>2008</sub>=0,564**

2009

- U14. Ł.P. Haliński, J. Szafranek, B.M. Szafranek, **M. Gołębiowski**, P. Stepnowski, (2009) Chromatographic fractionation and analysis of main components from eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf cuticular waxes. *Acta Chromatographica* 211, 127–137. **IF<sub>2009</sub>=0,676**
- U15. M. Sidwa-Gorycka, A. Królicka, A. Orlita, E. Maliński, **M. Gołębiowski**, J. Kumirska, A. Chromik, E. Biskup, P. Stepnowski, E. Łojkowska, (2009) Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97, 59–69. **IF<sub>2009</sub>=1,271**
- U16. **M. Gołębiowski**, M. Paszkiewicz, Ł. Haliński, E. Maliński, P. Stepnowski, (2009) Chemical composition of commercially available essential oils from eucalyptus, pine, ylang and juniper. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 278-279. **IF<sub>2009</sub>=0,572**
- U17. N. Filipowicz, Piotr Madanecki, **M. Gołębiowski**, P. Stepnowski, R. J. Ochocka, (2009) HS SPME GC analysis reveals the population variability of terpene contents in *Juniperus communis* needles. *Chemistry & Biodiversity* 6, 2290-2301. **IF<sub>2009</sub>=1,926**
- U18. M. Czerwicka, S. Stolte, A. Muller, E.M. Siedlecka, **M. Gołębiowski**, J. Kumirska, P. Stepnowski, (2009) Identification of ionic liquid breakdown products in an advanced oxidation system. *Journal of Hazardous Materials* 171, 478–483. **IF<sub>2009</sub>=4,144**
- U19. E.M. Siedlecka, **M. Gołębiowski**, Z. Kaczyński, J. Czupryniak, T. Ossowski, P. Stepnowski, (2009) Degradation of ionic liquids by fenton reaction; the effect of anions as counter and background ions. *Applied Catalysis B-Environmental* 91, 573–579. **IF<sub>2009</sub>=5,252**
- 2010**
- U20. A. Mika, **M. Gołębiowski\***, J. Szafranek, J. Rokicki, P. Stepnowski, (2010) Identification of lipids in the cuticle of the parasitic nematode *Anisakis simplex* and the somatic tissues of the atlantic cod *Gadus morhua*. *Experimental Parasitology* 124, 334–340. **IF<sub>2010</sub>=1,869**
- U21. M.I. Boguś, M. Czygier, **M. Gołębiowski**, E. Kędra, J. Kucińska, J. Mazgajska, J. Samborski, W. Wieloch, E. Włóka, (2010) Insect cuticular fatty acids affect *in vitro* growth and pathogenicity of entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Experimental Parasitology* 125, 400–408. **IF<sub>2010</sub>=1,869**
- U22. N. Migowska, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, **M. Gołębiowski**, J. Kumirska, (2010) Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 3029-3034. **IF<sub>2010</sub>=3,841**

- U23. **M. Gołębiowski**, E. Maliński, M. Szankin, M. Marszeniuk, M. Paszkiewicz, P. Stepnowski, (2010) Determination of catechin and epicatechin in the peel of apple varieties resistant and non-resistant to apple scab. *Chemical Papers* 64, 729–733. **IF<sub>2010</sub>=0,754**
- U24. G. Boczkaj, **M. Gołębiowski**, M. Kamiński, P. Stepnowski, (2010) Identyfikacja lotnych składników ścieków z instalacji oksydacji asfaltów z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). *Postępy Chromatografii i Technologii Rozdzielania* 131-139.
- U25. **M. Gołębiowski**, M. Paszkiewicz, Ł. Haliński, P. Stepnowski, (2010) HPLC of Plant Lipids W: High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, ISBN 978-1-4200-9260-8, CRC Press, Taylor & Francis Group, 425-452.

### 2011

- U26. **M. Gołębiowski**, E. Siedlecka, M. Paszkiewicz, K. Brzozowski, P. Stepnowski, (2011) Perfluorocarboxylic acids in cell growth media and technologically treated waters: Determination with GC and GC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54, 577–581. **IF<sub>2011</sub>=2,967**
- U27. Ł.P. Halinński, M. Paszkiewicz, **M. Gołębiowski**, P. Stepnowski, (2011) The chemical composition of cuticular waxes from leaves of the gboma eggplant (*Solanum macrocarpon* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* 25, 74-78. **IF<sub>2011</sub>=2,079**

### 2012

- U28. A. Mika, **M. Gołębiowski**, E. F. Skorkowski, P. Stepnowski, Comparison of fatty acids and sterols composition in brown shrimp *Crangon crangon* and herring *Clupea harengus membras* from the Baltic Sea. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 41 (2012) 57-64. **IF<sub>2012</sub>=0,400**
- U29. E. Biskup, **M. Gołębiowski**, R. Gniadecki, P. Stepnowski, E. Łojkowska, (2012) Triterpenoid  $\alpha$ -amyirin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta Biochimica Polonica* 59, 255-260. **IF<sub>2012</sub>=1,185**
- U30. Y. Deng, P. Besse-Hoggan, P. Husson, M. Sancelme, A.-M. Delort, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, **M. Gołębiowski**, M.F. Costa Gomes, (2012) Relevant parameters for assessing the environmental impact of some pyridinium, ammonium and pyrrolidinium based ionic liquids. *Chemosphere* 89, 327-333. **IF<sub>2012</sub>= 3,137**
- U31. E. M. Siedlecka, S. Stolte, **M. Gołębiowski**, A. Nienstedt, P. Stepnowski, J. Thöming, (2012) Advanced oxidation process for the removal of ionic liquids from water: the influence of functionalized side chains on the electrochemical degradability of imidazolium cations. *Separation and Purification Technology* 101, 26-33 **IF<sub>2012</sub>=2,894**

- U32. B. Szafranek, M. Paszkiewicz, **M. Gołębiowski**, P. Stepnowski, (2012) Gas chromatographic analysis of plant and insect surface compounds: cuticular waxes and terpenoids. ISBN 979-953-307-736-8 W „Gas Chromatography in Plant Science, Wine technology, Toxicology and Some Specific Applications” In Tech, 32-72.
- U33. **M. Gołębiowski**, (2012) Metody analizy jakościowej i ilościowej lipidów powierzchniowych i wewnętrznych owadów. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 284–293.
- U34. M. Cerkowniak, M. Paszkiewicz, A. Grubba, M.I. Boguś, M. Dawgul, W. Kamysz, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski**, (2012) Wstępna identyfikacja kutykularnych i wewnętrznych alkoholi larw i poczwerek *Calliphora vomitoria* i *Calliphora vicina* jako związków antygrzybowych i antybakteryjnych. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 306–312.
- U35. M. Cerkowniak, M. Paszkiewicz, D. Wirkus, M.I. Boguś, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski**, (2012) Aktywność biologiczna kutykularnych kwasów tłuszczowych dorosłych owadów *Calliphora vomitoria*. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 321–328.
- U36. **M. Gołębiowski**, M. Paszkiewicz, M. Popławska, A. Grubba, M.I. Boguś, P. Stepnowski, (2012) Zastosowanie technik chromatograficznych i technik łączonych do analizy jakościowej i ilościowej lipidów kutykularnych owadów wykazujących aktywność biologiczną. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 294–299.
- U37. **M. Gołębiowski**, M. Paszkiewicz, M. Popławska, A. Grubba, A. Oleszczak, M.I. Boguś, P. Stepnowski, (2012) Identyfikacja związków obecnych w lipidach kutykularnych *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria* i *Sarcophaga carnaria* o potencjalnej aktywności biologicznej. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 300–305.
- U38. D. Wirkus, M. Paszkiewicz, A. Sikora, J. Sychowska, M. Cerkowniak, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski**, (2012) Analiza składu lipidów dorosłych owadów *Blatta orientalis* i *Blattella germanica*. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 313–320.
- U39. A. Urbanek, R. Szadziewski, J. Boros-Majewska, I. Gabriel, M. Dawgul, W. Kamysz, D. Sosnowska, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski**, (2012) Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze wydzieliny produkowanej przez larwy kuczmanów z rodzaju *Forcipomyia*



(Diptera: Ceratopogonidae). W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 329–333.

- U40. M. Paszkiewicz, A. Topij, D. Wirkus, M. Cerkowniak, M.I. Boguś, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski**, (2012) Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy jakościowej i ilościowej metabolitów wtórnych entomopatogennych grzybów. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ISBN 978-83-62830-11-4, 253–262.

### 2013

- U41. A. Mika, E. Skorkowski, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski\***, (2013) Identification of lipid components in the abdominal muscle of fall-caught *Crangon crangon* from a coastal area of the Baltic sea. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 24, 439-448. **IF<sub>2013</sub>=1,253**
- U42. M. Paszkiewicz, E. Tokarska-Pietrzak, **M. Gołębiowski**, D. Kunikowska, P. Stepnowski, (2013) Plasmid- and chromosomal genes-encoded two separate O-polysaccharide chains of Salmonella Uccle (O:3,54) - structural elucidation. *Journal of Structural Biology* 184, 367–374  
**IF<sub>2013</sub>= 3,369**
- U43. A. Mika, E. Skorkowski, P. Stepnowski, **M. Gołębiowski\***, (2013) The lipid composition of the abdominal muscle of shrimp *Crangon crangon* from the Gulf of Gdansk in spring and winter periods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 1825–1833  
**IF<sub>2013</sub>=1,129**
- U44. M. Słocińska, N. Antos-Krzeminska, **M. Gołębiowski**, M. Kuczer, P. Stepnowski, G. Rosinski, W. Jarmuszkiewicz, (2013) UCP4 expression changes in larval and pupal fat bodies of the beetle *Zophobas atratus* under adipokinetic hormone treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 166, 52-59. **IF<sub>2013</sub>= 2,371**
- U45. E. Biskup, B. Szykklarz, **M. Gołębiowski**, K. Borsuk, P. Stepnowski, E. Łojkowska, (2013) Composition and biological activity of *Rhaponticum carthamoides* extracts obtained from plants collected in Poland and Russia. *Journal of Medicinal Plants Research* 7, 687-695.

### 2014

- U46. **M. Gołębiowski**, E. Doleżyńska-Sewerniak, E. Zygier, (2014) Chemical Analysis of Historic Art and Painting Conservation Materials (19th and 20th centuries) from the National Museum in Krakow by Gas Chromatography – Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectroscopy Letters* 47, 57–75. **IF<sub>2013</sub>= 0,718**

U47. A. Mika, **M. Gołębiowski**, E. Skorkowski, P. Stepnowski, (2014) Lipids of adult brown shrimp, *Crangon crangon*: seasonal variations in fatty acids class composition. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 94, 993–1000. **IF<sub>2013</sub>=1,129**

*Publikacje naukowe opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora*

U48. B. Skwarzec, D.I. Strumińska, J. Ulatowski, **M. Gołębiowski**, (2001) Determination and distribution of polonium <sup>210</sup>Po in tobacco plant from Poland. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 250, 319-322. **IF<sub>2007</sub> = 0,499**

U49. J. Falandysz, M. Kawano, D. Danisiewicz, A. Chwir, L. Boszke, **M. Gołębiowski**, A. Boryło, (1996) Badania nad występowaniem rtęci w glebach w Polsce. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 29 (2), 177-181.

U50. J. Falandysz, M. Kawano, D. Danisiewicz, A. Chwir, P. Stepnowski, L. Boszke, **M. Gołębiowski**, (1996) Rtęć ogółem w śródlądowych i przybrzeżnych osadach dennych z różnych miejsc na terenie Polski. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 29 (2), 183-186.

U51. J. Szafranek, E. Maliński, J. Nawrot, B. Szafranek, E. Synak, E. Dubis, **M. Gołębiowski**, Z. Winiecki, (1998) Badanie wpływu wosków powierzchniowych ziemniaka *Solanum tuberosum* ze szczególnym uwzględnieniem seskwiterpenów oraz olejków eterycznych na zachowanie stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Postępy w Ochronie Roślin*, 38, 36-43.

## 7. Dalsze plany naukowe

Analiza związków pochodzenia naturalnego, zwłaszcza związków wykazujących aktywność biologiczną jest bardzo ważna nie tylko ze względów poznawczych, ale może stanowić źródło związków aktywnych biologicznie. Dotychczas analizowane były lipidy owadów, które nie były poddane stresowi środowiskowemu. Obecne plany obejmują cztery główne kierunki badań:

1. Wspólnie z pracownikami **Instytutu Parazytologii PAN w Warszawie** zaplanowane zostały i są już prowadzone badania lipidów owadów, które zostały zainfekowane entomopatogenicznymi grzybami oraz poddane działaniu insektycydów. Pierwsze uzyskane wyniki wskazują na to, że skład jakościowy i ilościowy związków kutykularnych owadów się zmienia, więc reakcją obronną owadów jest prawdopodobnie synteza nowych związków obronnych, które mogą posiadać aktywność biologiczną, które z kolei będzie można wykorzystać np. w medycynie lub jako środki do zwalczania pasożytów. Wspólnie

z pracownikami tej Jednostki badane są również metabolity wtórne entomopatogenicznych grzybów pod kątem poszukiwania związków aktywnych biologicznie. Grzyby hodowane są w różnych warunkach, tak aby w zależności od tych czynników mogły wytwarzać różnorodne metabolity wtórne.

2. Kontynuowana również (i rozszerzana) będzie współpraca z pracownikami **Uniwersytetu Gdańskiego Wydziału Biologii**. Wspólnie zaplanowane są badania owadów poddanych stresowi. Owady będą karmione pożywieniem z zarodnikami grzybów, z środkami ochrony roślin i z antybiotykami. Sprawdzany będzie wpływ tych czynników na indukcję syntezy związków o silnych właściwościach biologicznych (substancji obronnych), które można będzie użyć w celu przygotowania preparatów biobójczych.
3. Obecnie rozpoczęłam również analizy chemiczne pomidorów zarażonych i niezarażonych szarą pleśnią. Przędziorki, które są szkodnikami pomidorów lepiej rozwijają się na pomidorach zarażonych szarą pleśnią. Obserwacje te zostały poczynione przez pracowników **Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu** i dlatego też wspólnie z nimi będę starał się zidentyfikować metabolity wtórne roślin zarażonych i niezarażonych oraz metabolity grzybów odpowiedzialne za ten stan rzeczy. Tematyka tej współpracy jest bardzo interesująca, ponieważ prawdopodobnie metabolity wtórne tych organizmów posiadają silnie właściwości biologiczne.
4. Czwarty temat będzie podjęty wspólnie z pracownikami **Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach**. Pracownicy tego Uniwersytetu zidentyfikowali dwa gatunki grzybów z rodzaju *Hirsutella* (*Hirsutella danubiensis* i *H. vandergeesti*), których metabolity wtórne zostaną przebadane pod kątem poszukiwania „nowych” związków aktywnych biologicznie. Będą też analizowane metabolity wtórne przędziorków infekowanych tymi grzybami.

Wszystkie zidentyfikowane związki będą badane pod kątem aktywności biologicznej w Instytucie Parazytologii PAN w Warszawie i na **Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**. Identyfikacja metabolitów wtórnych roślin, owadów, roztoczy i grzybów może pozwolić w przyszłości na dostarczenie „nowych” związków aktywnych biologicznie, które mogą być stosowane w medycynie, chemii i rolnictwie.

## 8. Sumaryczne zestawienie danych bibliometrycznych

Charakter pracy	Po uzyskaniu stopnia doktora
Liczba opublikowanych prac oryginalnych	51
w tym w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej	49
Liczba publikacji wchodząca w skład osiągnięcia naukowo-badawczego	16
w tym w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej	16
Liczba opublikowanych prac przeglądowych	2
w tym w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej	2
Liczba rozdziałów w książkach	10
Liczba prac w materiałach zjazdowych	2
Liczba komunikatów	92
Sumaryczny IF <sup>1</sup> wszystkich prac	98,580
Sumaryczna liczba cytowań <sup>2</sup> wszystkich prac	426 (bez autocytowań 281)
Sumaryczny IF <sup>1</sup> prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego	38,816
Sumaryczna liczba cytowań <sup>2</sup> prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego	101
Indeks Hirscha <sup>3</sup>	13

<sup>1</sup> Wartości IF zgodnie z rokiem opublikowania oprócz prac z lat 2014-2015 (brak wskaźnika)

<sup>2</sup> Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) z dnia 02.01.2015

<sup>3</sup> Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS) z dnia 02.01.2015

Gołębowski