

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Bojke zatytułowanej
*Zmienność składu chemicznego lotnych i średniolotnych związków wytwarzanych przez wybrane
gatunki owadów pod wpływem infekcji grzybiczych*
wykonanej w Katedrze Analizy Środowiska Wydziału Chemii
Uniwersytetu Gdańskiego

Ocena wyboru tematyki badawczej

Obecnie, naukowcy coraz częściej wykorzystują mechanizmy fizyczne i chemiczne zjawisk i procesów zachodzących w przyrodzie do planowania swoich badań naukowych. Przykładem może być wykorzystanie owadów jako modelowych organizmów w badaniach nad patogenezą infekcji grzybiczych. Dlatego tak ważne stają się prace dotyczące określenia jakościowego i ilościowego związków lotnych wydzielanych przez owady, które są istotne w kontekście infekcji grzybiczej. Lotne związki, takie jak feromony i inne substancje chemiczne wydzielane przez owady, mogą przyciągać lub odstraszać inne osobniki, wpływając na zachowania oraz migrację owadów. Zrozumienie tych mechanizmów może pomóc w opracowaniu kontroli przemieszczania się owadów, co jest kluczowe w przypadku chorób grzybiczych roślin. Ponadto, związki lotne emitowane przez owady mogą stanowić sygnał ostrzegawczy dla roślin, informując o obecności patogenów. Badanie tych substancji może przyczynić się do opracowania systemów wczesnego ostrzegania przed infekcjami grzybiczymi, umożliwiając szybką interwencję i ograniczenie rozprzestrzeniania się chorób. Dodatkowo, poznanie profilu związków lotnych wydzielanych przez owady w obliczu infekcji grzybiczej może pomóc w identyfikacji konkretnych gatunków grzybów, które są przenoszone przez owady. To z kolei umożliwia bardziej ukierunkowane działania w zakresie ochrony roślin, zarówno poprzez opracowanie nowych metod kontroli tych związków wydzielanych przez owady, jak i doskonalenie istniejących strategii zwalczania chorób wywołanych przez grzyby entomopatogeniczne. Dlatego też, badanie zawartości związków lotnych wydzielanych przez owady jest kluczowe dla zrozumienia ekosystemu roślinnego i opracowania skutecznych strategii prewencji oraz zwalczania infekcji grzybiczych, co ma bezpośrednie znaczenie dla ochrony upraw i zachowania stabilności ekosystemów rolniczych. To właśnie tym zagadnieniom, Pani mgr Aleksandra Bojke, poświęciła swoją rozprawę doktorską, realizując ją pod bezpośrednią opieką Pana dra hab. Marka Gołębiowskiego, prof. UG jako promotora.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma formę monografii naukowej, co wymagało znacznego nakładu pracy, ale jednocześnie stworzyło Doktorantce nieograniczone możliwości wnikliwego omówienia bardzo obszernej ilości uzyskanych wyników. Całość rozprawy liczy 246 stron. Otwiera ją streszczenie w języku polskim i angielskim. Następnie Doktorantka zamieściła wykaz skrótów i wprowadzenie, a w kolejnej części dokonała przeglądu literatury (13 stron). Integralną częścią rozprawy doktorskiej jest 192 stronicowa część doświadczalna, którą rozpoczyna cel pracy i opis stosowanych metodyk badawczych, zestawienie wyników i ich dyskusja, podsumowanie i wnioski, a zamyka ją spis literatury oraz zestawienie dorobku naukowego Doktorantki.

Część literaturowa pracy, składająca się z sześciu rozdziałów i ujęta jedynie na 13 stronach, może budzić wątpliwości co do znajomości literatury przedmiotu przez Doktorantkę. Jednak przy bliższym spojrzeniu na wykorzystaną literaturę, obejmującą aż 310 pozycji, jestem pełna podziwu, że tak obszerny zakres wiedzy został aż tak zwięźle przedstawiony na kilkunastu stronach. Na początku tej części pracy Pani mgr Aleksandra Bojke przeprowadziła krótką charakterystykę grzybów entomopatogenicznych, następnie opisała kolejno mechanizmy obronne jakie wytwarzają owady przed infekcją grzybiczą, znaczenie związków wytwarzanych przez owady oraz wykorzystanie owadów w medycynie. W jednym z rozdziałów Doktorantka zamieściła charakterystykę materiału badawczego, przeprowadzając ją pod kątem dokonania wyboru materiału do części eksperymentalnej. Dwa ostatnie podrozdziały tej części rozprawy doktorskiej powinny być szczególnie istotne dla pracy analityka, ponieważ stanowią bardzo wnikliwe studia literaturowe najnowszych osiągnięć w zakresie zarówno przygotowania próbek do analizy, jak i końcowego oznaczenia wyizolowanych analitów. W tym miejscu Doktorantka wykazała się również kreatywnością w skompresowaniu osiągnięć innych badaczy i przedstawiła ją w formie dwóch tabel. Pani mgr Aleksandra Bojke tym przeglądem uzasadniła celowość swoich badań bazujących na wykorzystaniu narzędzi analitycznych i statystycznych w celu uzyskania wiarygodnych wyników. Praca doktorska, mimo zauważonych drobnych uwag, prezentuje wysoki poziom poprawności językowej. Doktorantka wykazała się umiejętnością klarownego wyrażania myśli oraz precyzyjnym doбором słownictwa. Co więcej, strona edytorskiej tej części pracy została starannie opracowana, co przyczynia się do ogólnej estetyki i czytelności pracy.

W dalszej części rozprawy doktorskiej, Pani mgr Aleksandra Bojke precyzyjnie przedstawiła nadrzędny cel, który dotyczył określenia zmienności składu chemicznego lotnych i średniolotnych związków wytwarzanych przez wybrane gatunki owadów pod wpływem infekcji grzybiczych. Dodatkowo, Doktorantka zdefiniowała cele szczegółowe, które dostarczają solidnej podstawy do zrozumienia problemu badawczego. W tym miejscu pragnę podkreślić, że realizacja założonego celu głównego i zdań badawczych wymagała ogromnego nakładu pracy Doktorantki poczynając od wyboru odpowiedniego materiału do badań, poprzez poprawne zaplanowanie i wykonanie eksperymentów, do dojrzałej

i wnikliwej interpretacji wyników. Chciałbym wyrazić uznanie dla ogromu tej żmudnej pracy i trudu jaki został włożony w realizację poszczególnych zadań.

Część doświadczalną pracy Doktorantka rozpoczęła od zestawienia wszystkich stosowanych odczynników, aparatury i przygotowania wzorców oraz opisała materiał wybrany do badań w odniesieniu do owadów (sześć gatunków), jak i grzybów entomopatogenicznych (cztery gatunki) wraz z krótkim uzasadnieniem. Kolejny rozdział to *Metodyka badawcza* obejmująca hodowlę owadów i grzybów oraz zaproponowane metodyki uwzględniające izolowanie wybranych związków za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikowej metodą Folcha i mikroekstrakcji do fazy stałej z analizą fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME) oraz oznaczanie jakościowe i ilościowe badanych związków z wykorzystaniem chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas. Ta część pracy doświadczalnej została zakończona opisem analizy głównych składowych. Uważam, że Doktorantka powinna skoncentrować się na uzasadnieniu wykorzystania PCA do opracowania własnych wyników, zamiast jedynie prezentować teoretyczne aspekty związane z analizą głównych składowych.

Integralną częścią rozprawy doktorskiej jest rozdział *Wyniki i dyskusja*, który został podzielony na sześć podrozdziałów, gdzie Pani mgr Aleksandra Bojke zestawiła uzyskane przez siebie wyniki wraz z ich interpretacją. Zostały one pogrupowane względem związków średniolotnych i lotnych izolowanych z owadów, ciała tłuszczowego i larw, zarówno przed, jak i po infekcji grzybiczej oraz związków wytwarzanych pod wpływem tego zagrożenia. Doktorantka przeprowadziła analizę jakościową i ilościową szerokiej gamy związków (kwasy tłuszczowe, estry metylowe kwasów tłuszczowych, monoacyloglicerole, aminokwasy, alkohole, sterole, aldehydy i in.), która pozwoliła na określenie profili lotnych i średniolotnych związków zarówno przed, jak i po infekcji grzybiczej. Należy w tym miejscu podkreślić, że taka różnorodność materiału badawczego oraz związków o zróżnicowanych właściwościach wymagały od Doktorantki odmiennego podejścia analitycznego. Wnikliwa analiza uzyskanych wyników pozwoliła na określenie, które ze związków mogą być syntezowane pod wpływem infekcji grzybiczej jako odpowiedź obronna na to zagrożenie. Wyniki otrzymane dla próby kontrolnej (owady nienarażone na infekcję grzybiczą) umożliwiły Doktorantce wyselekcjonowanie związków, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju owadów, jak również te które mogą być odpowiedzialne za obronę przed infekcją. Bardzo zaciekawiły mnie eksperymenty przeprowadzone z sukcesem przez Panią mgr Aleksandrę Bojke w zakresie wskazania grupy związków (17 aldehydów) o potencjalnej aktywności przeciwgrzybiczej. Do osiągnięcia tego celu Doktorantka przeprowadziła testy określające minimalne stężenie aldehydów hamujące wzrost grzybów. Wyniki testów pokazały, że aldehydy wytwarzane przez owady posiadają zróżnicowane właściwości fungistatyczne, dlatego też mogą stanowić ochronę przed atakiem grzybów entomopatogenicznych. Ta część rozprawy doktorskiej jest bogata w rysunki (mapy ciepła, wykresy słupkowe, wykresy typu biplot dla analizy składowych głównych – łącznie 111) oraz tabele (łącznie 32) i doskonale dokumentuje uzyskane wyniki.

Jestem pod ogromnym wrażeniem ilości wykonanych eksperymentów i interpretacji rezultatów uzyskanych w wyniku ich przeprowadzenia. Należy podkreślić, że wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej zostały poddane walidacji i rygorystycznej analizie statystycznej oraz bardzo krytycznej ocenie. Uważam, że część doświadczalna została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie.

Dokonując oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej i dyskusji wyników za najbardziej wartościowe osiągnięcie pracy stanowiące jednocześnie element nowości naukowej uznaję:

- określenie profili lotnych i średniolotnych związków zidentyfikowanych przed i po infekcji grzybiczej,
- wyselekcjonowanie związków (aldehydów) o potencjalnej aktywności grzybiczej,
- aplikacyjność uzyskanych wyników badań w praktyce – możliwość wykorzystania związków wytwarzanych przez owady, jako potencjalnych środków przeciugrzybiczych i/lub przeciwbakteryjnych oraz do otrzymywania pestycydów pochodzenia naturalnego.

Zgodnie z Ustawą (art. 187 ust. 1-3) *rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, zaś jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego*. Przedmiotowe kryteria wyznaczają jasno obowiązki recenzenta w przewodzie doktorskim w celu sformułowania oceny. Uważam, że zaproponowane metody badawcze zostały gruntownie przemyślane i dostosowane do potrzeb realizacji wytyczonych celów. W analizie i dyskusji wyników Doktorantka nawiązała do dostępnych i aktualnych danych literaturowych (jak już wcześniej wspomniano to 310 pozycji), co świadczy o dobrej znajomości podjętej problematyki oraz bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu do badań. Dyskusję wyników Pani mgr Aleksandra Bojke podsumowała, aż dziewiętnastoma opisowymi wnioskami. Układ pracy jest przejrzysty, a materiał dokumentujący wyniki został dobrze przygotowany.

Uwagi szczegółowe

Do obowiązków recenzenta należy nie tylko podkreślenie walorów pracy, ale również zwrócenie uwagi na dostrzeżone niedociągnięcia. Tych ostatnich jest nie wiele, a zauważone uwagi nie mają charakteru negatywnego i nie wpływają na moją pozytywną ocenę oraz wysoką jakość przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Stanowią one jedynie podstawę do konstruktywnej dyskusji podczas obrony rozprawy doktorskiej, dlatego też proszę o wyjaśnienie:

- czy oznaczone zawartości poszczególnych związków były przeliczane na gram owada czy może na osobnika?
- rozdział 1.4.5, str. 39 – Proszę o wyjaśnianie jaka końcowa objętość rozpuszczalników była po przeprowadzeniu w pochodne związków? Jeżeli poniżej 1 ml to czym kierowano się przy doborze objętości (10 µl) dodatku wzorca wewnętrznego o stężeniu

1 mg/ml? Proszę o uzasadnienie wyboru tylko jednego kwasu 19-metyloarachidowego jako wzorca wewnętrznego przy tak złożonych analizach kwasów tłuszczowych, steroli, estrów kwasów tłuszczowych i innych związków,

- tabela 10, str. 122 – proszę o wyjaśnienie obliczonych wartości LOQ odnosząc się do opisu na stronie 4, gdzie Doktorantka pisze, że $LOQ=3 \cdot LOD$. Wartości LOQ nie korelują z tą zależnością. Do jakiego parametru odnosi się wyznaczona precyzja?
- tabela 10, str. 122 – w jaki sposób wyznaczono wartości odzysku? Jak Doktorantka wytłumaczy tak duże rozbieżności w odzysku sięgające nawet 80% w przypadku np. 2-metylobutanalu?
- czy podejmowano próbę wyznaczenia efektu matrycy?
- zamieszczenie słupków standardowych odchylen na wykresach słupkowych (np. Rys. 12, 15, 18, itd.). Niektóre z nich przewyższają zawartości poszczególnych związków,
- str. 219 - proszę o wyjaśnienie wniosku oznaczonego jako 12, cytując: *Wpływ na skład zidentyfikowanych związków w owadach ma również metoda ekstrakcji badanego materiału,*
- terminu *izolacja* i *optymalizacja*, które dość często pojawiają się w rozprawie doktorskiej.

Przed podsumowaniem recenzji rozprawy doktorskiej chcę odnieść się pozytywnie do całokształtu dorobku naukowego Doktorantki. Jest współautorką dziesięciu artykułów, z których pięć związanych jest tematycznie z rozprawą doktorską. Artykuły te ukazały się w interdyscyplinarnej bazie *Journal Citation Reports* w dobrych czasopismach chemicznych oraz biologicznych, takich jak: *Mycologia*, *Journal of Microbiological Methods*, *Physiological Entomology*, *Naturwissenschaften*, *Microbiological Research*, *Chemical Papers (dwie prace)*, *Biomedical Chromatography*, *Chemistry & Biodiversity* oraz *ISJ-Invertebrate Survival Journal*). Ponadto, Doktorantka jest współautorką rozdziału w monografii oraz krótkiego artykułu z tematyki doktoratu w materiałach pokonferencyjnych (pierwszy autor). Wyniki badań były również prezentowane w postaci trzynastu komunikatów konferencyjnych (5 referatów tematycznie związanych z rozprawą doktorską) i dwudziestu sześciu posterów (w tym 13 z tematyki rozprawy doktorskiej). Pani mgr Aleksandra Bojke była kierowniczką i/lub wykonawczynią w pięciu projektach (PRELUDIUM 11 - NCN; Badań Młodych Naukowców – łącznie 3; POLNOR - NCBiR). Znaczna część pracy badawczej, jak informuje Doktorantka, była zrealizowana przy wsparciu Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nt. *Identyfikacja związków wytwarzanych przez owady pod wpływem infekcji grzybiczej z zastosowaniem HS-SPME-GC/MS* (PRELUDIUM 11), który został rozliczony pozytywnie.

Podsumowując rozprawę doktorską przygotowaną przez Panią mgr Aleksandrę Bojke należy podkreślić, iż została ona przygotowana w sposób przejrzysty i staranny, uwypuklono uzyskane wyniki z uwzględnieniem zaproponowanych procedur analitycznych izolowania i oznaczania wybranych analitów oraz narzędzi statystycznych do zaprezentowania obszernej ilości wyników. Wskazane pewne drobne niedoskonałości nie wpływają negatywnie na ogólną wartość przedstawionej rozprawy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując swoją recenzję podkreślam, że wszelkie umieszczone powyżej krytyczne uwagi oraz pytania mają na celu zwrócenie uwagi Doktorantki na sprawy warte pogłębionej analizy w dalszych badaniach, natomiast sama rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Bojke spełnia według mnie wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dowodzi nabycia przez Doktorantkę odpowiedniej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności zastosowania tej wiedzy przy rozwiązywaniu zagadnień badawczych. Przedstawiona mi rozprawa jest też oryginalnym, autorskim rozwiązaniem problemu naukowego dotyczącego określenia wpływu infekcji grzybiczej na skład związków wytwarzanych przez wybrane owady. Biorąc wszystkie wymienione elementy oceny pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Pani mgr Aleksandry Bojke zatytułowana *Zmienność składu chemicznego lotnych i średniolotnych związków wytwarzanych przez wybrane gatunki owadów pod wpływem infekcji grzybiczych*, spełnia kryteria określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2023 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami) spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim, więc wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Gadziś-Kopcińska
Toruń, dnia 15 listopada 2023 r.

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Bojke zatytułowanej *Zmienność składu chemicznego lotnych i średniolotnych związków wytwarzanych przez wybrane gatunki owadów pod wpływem infekcji grzybiczych*.

Zgodnie z przedłożonym mi *Regulaminem wyróżniania doktoratów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego* Doktorantka posiada w swoim dorobku naukowym 5 publikacji (z bazy JCR) z tematyki doktoratu, gdzie w dwóch z nich jest pierwszym autorem. Doktorantka zaliczyła dodatkowo do dorobku naukowego związanego z rozprawą dokorską krótką informację (*Short Communication*) w materiałach konferencyjnych. Należy jednak podkreślić, że na część badań realizowanych w ramach doktoratu otrzymała dofinansowane z NCN (PRELUDIUM 11) i rozliczyła pozytywnie ten projekt.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykazuje wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się doskonałymi kompetencjami w obszarze chemii analitycznej i wykorzystywaniu zaawansowanych technik instrumentalnych do przeprowadzenia kompleksowej analizy związków o różnych właściwościach fizykochemicznych. Jestem pod wrażeniem otwartości Doktorantki na nauki biologiczne, co świadczy o jej wszechstronności i elastyczności w podejściu do problematyki badawczej. Jej aktywny udział w konferencjach naukowych to z pewnością dodatkowy atut, świadczący o jej zaangażowaniu i gotowości do dzielenia się wiedzą z innymi naukowcami. Dodatkowo, doceniam wartości aplikacyjne uzyskanych wyników, co dodaje jeszcze większej rangi pracy doktorskiej.

Na podstawie powyższych argumentów oraz tych zamieszczonych w recenzji, popieram wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Bojke o ile zostaną spełnione pozostałe warunki *Regulaminu*. Jej praca jest godna uznania i stanowi znaczący wkład w rozwijanie wiedzy naukowej w zakresie chemii (zwłaszcza chemii analitycznej) oraz entomologii stosowanej o szczególnym znaczeniu dla gospodarki i zdrowia człowieka.

Renata Gadzała-Kopciuch
Toruń, dnia 15 listopada 2023 r.