



Ekstrakcja olejków eterycznych i możliwości ich zastosowania w zwalczaniu pleśniakowca lśniącego, *Alphitobius diaperinus* Panzer.

mgr Beata Zawitowska

Opiekunowie pracy doktorskiej:

dr hab. Maryla Szczepanik, prof. UMK Toruń

prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk, UP Wrocław



Problem

Masowe występowanie pleśniakowca Iśniącego w kurnikach i brojlerniach



Zródło: <http://www.wipasz.pl/nasza-oferta/doradcy/czytaj/glowne-przyczyny-wystepowania-biegunek-u-drobitlu/>

Zródło: http://en.wikipedia.org/wiki/Alphitobius_diaperinus

Zródło: <http://olx.pl/oferta/pleśniakowca-i-śniacy-zwalczanie-pleśniakowca-na-fermach-CID619-ID23IGh.html>

Cel rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej było wyizolowanie olejków eterycznych z wybranych gatunków roślin oraz ocena ich właściwości insektycydalnych i możliwości zastosowania w zwalczaniu i pleśniakowca lśniącego, *Alphitobius diaperinus*.

Zakres części chemicznej pracy doktorskiej obejmował

- ✓ pozyskanie olejków eterycznych z wybranych gatunków roślin metodą destylacji z parą wodną z wykorzystaniem aparatu Derynga.
- ✓ Zbadanie składu chemicznego poszczególnych destylatów.
- ✓ Wykonanie widm magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR dla olejków oraz ich głównych komponentów.
- ✓ Określono również zmianę składu chemicznego wybranych olejków eterycznych w czasie oraz szybkość parowania acetonu.

Badania biologiczne pozwoliły ocenić aktywność ekstraktów roślinnych oraz ich głównych składników w stosunku do larw i postaci imaginalnych *A. diaperinus* w tym:

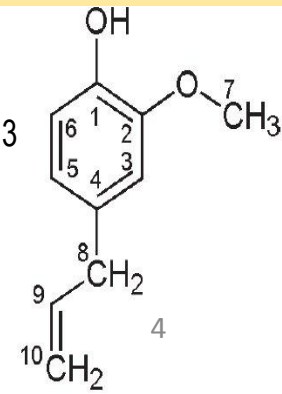
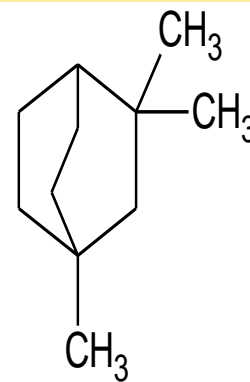
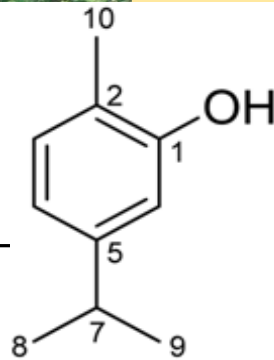
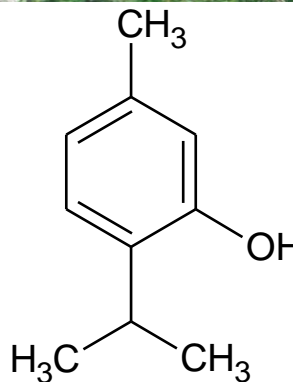
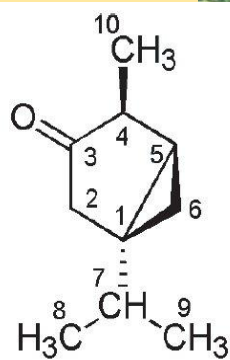
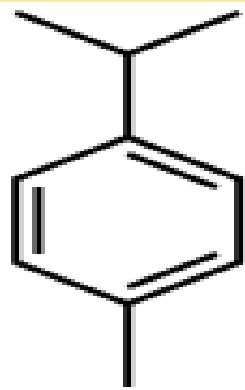
- ✓ właściwości deterentne,
- ✓ wpływ olejków na rozwój szkodnika od stadium larwy do postaci dorosłej,
- ✓ wpływ olejków na strukturę jelita środkowego
- ✓ wpływ wyselekcjonowanych terpenów na aktywność wybranych enzymów trawiennych larw pleśniakowca lśniącego.
- ✓ Ustalenie efektywnych dawek olejków eterycznych wobec larw i chrząszczy pleśniakowca lśniącego

Badania chemiczne Materiał roślinny



Olejki eteryczne izolowano z :

- ❖ wrotyczu pospolitego *Tanacetum vulgare* (astrowate: Asteroideae)
- ❖ bylicy piołun *Artemisia absinthium* (astrowate: Asteroideae)
- ❖ żywotnika zachodniego *Thuja occidentalis* (cyprysowate: Cupressaceae)
- ❖ tymianku pospolitego *Thymus vulgaris* (jasnotowate: Lamiaceae)
- ❖ szalwii lekarska *Salvia officinalis* (jasnotowate: Lamiaceae)
- ❖ oregano greckiego *Oregano vulgare* subsp. *hirtum* (jasnotowate: Lamiaceae)
- ❖ anyżu gwiaździstego *Illicium verum* (magnoliowate: Magnoliaceae)
- ❖ eukaliptusa właściwego *Eucalyptus globulus* (mirtowate: Myrtaceae)
- ❖ goździkowca korzennego *Eugenia caryophyllata* (mirtowate: Myrtaceae)
- ❖ barszczu mantegazyjskiego *Heracleum mantegazzianum* (selerowate: Apiaceae).
- ❖ Przebadano również główne komponenty olejków eterycznych.



Analiza GC-MS

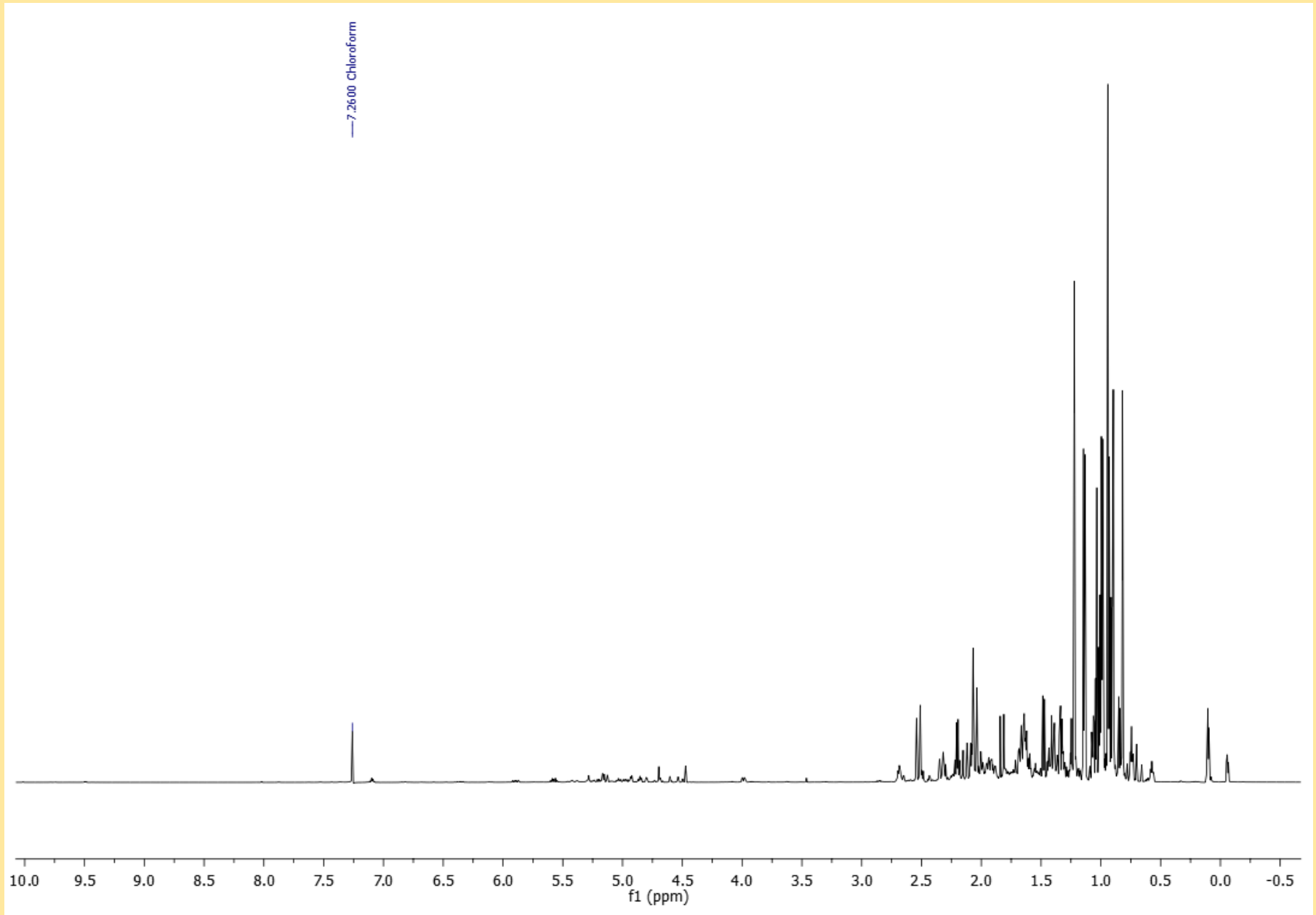
- ❖ Analizy jakościowe i ilościowe otrzymanych destylatów wykonane zostały przy pomocy aparatu GC-MS SATURN 2000 firmy Varian Chrompak, stosując metodę *electron impact* (70eV) lub jonizację chemiczną względem izobutanu.
- ❖ Związki zidentyfikowano w oparciu o widma rozpadu masowego zgromadzonych w bibliotece NIST 2009, indeksów retencji Kovaca, bazę MassFinder 4.0 oraz widm otrzymanych dla substancji wzorcowych. W celu wyznaczenia indeksów retencji Kovaca zastosowano serię nastrzyków n-alkanów od C-6 do C-28.

Tab 1. Zawartość procentowa (%) głównych składników olejków eterycznych

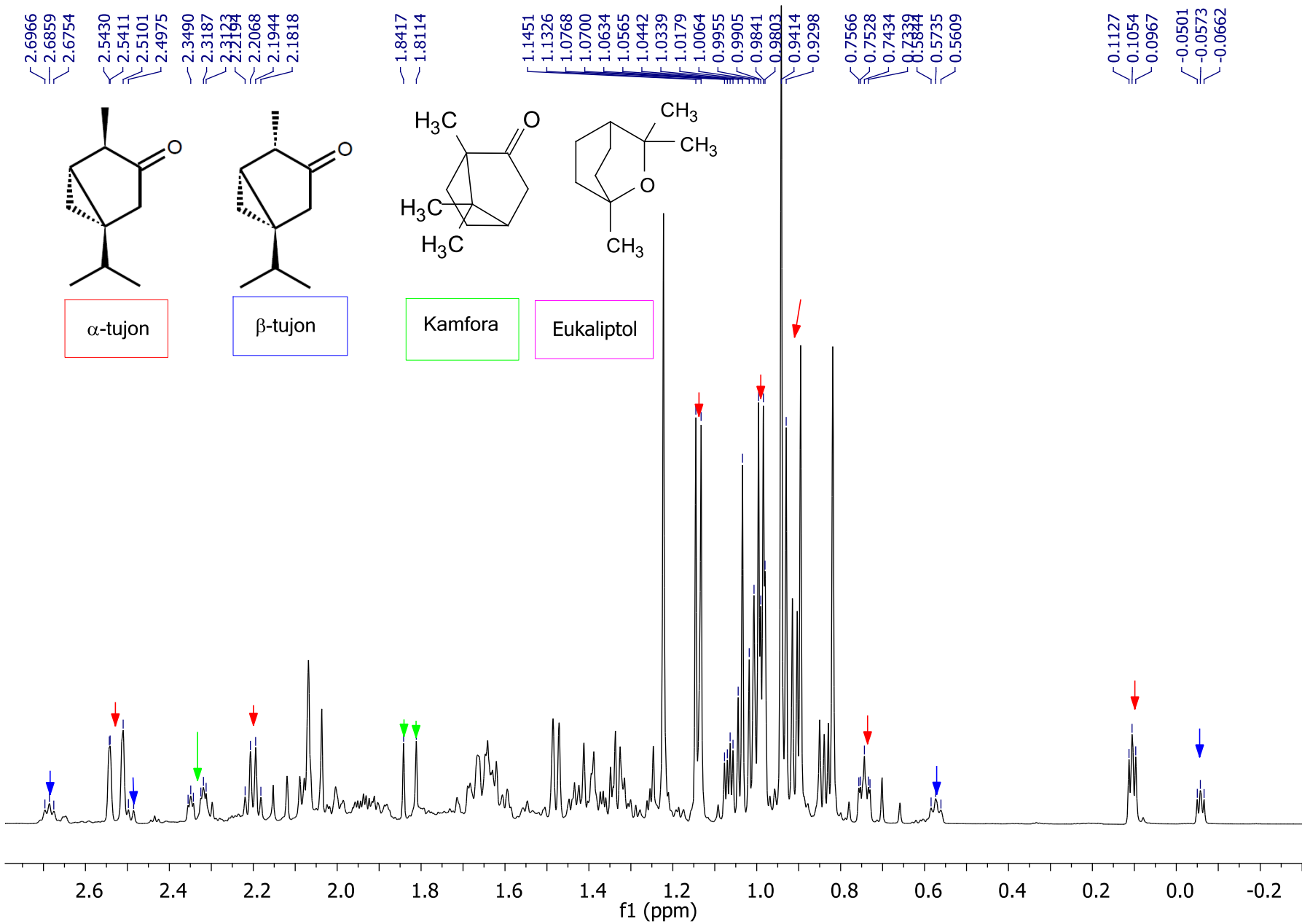
Związek	Główny składnik	Procentowa zawartość [%]	Pozostałe [%]
Żywotnik zachodni	α - tujon	69.8	β - tujon 9.5
Wrotycz pospolity	β - tujon	61.0	kamfora 9.7 eukaliptol 3.2
Szałwia lekarska (PL)	α - tujon	41.8	β - tujon 6.4 kamfora 12.5
Szałwia lekarska (H)	α - tujon	17.6	β - tujon 11.1 kamfora 14.7
Bylica piołun	α - tujon	12.7	β - tujon 2.8 p-cymen 2.9
Anyż gwiazdzisty	(E)-anetol	90.8	limonen 2.6
Goździkowiec korzenny	eugenol	92.6	octan eugenolu 5.6
Tymianek pospolity	tymol	76.3	karwakrol 6.5
Oregano subs. hirtum	karwakrol	84.4	p-cymen 3.5 γ - terpinen 3.9
Eukaliptus właściwy	eukaliptol	68.3	p-cymen 10.2 limonen 12.8
Barszcz mantegazyjski	p-cymen	42.8	γ - terpinen 9.7 limonen 9.4

Analiza NMR

- ✓Widma ^1H NMR wykonano na spektrometrach: Bruker Avance II 600 MHz (Laboratorium Badań Strukturalnych NMR Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej).
- ✓Analizy wykonano w roztworach CDCl_3 dla olejków eterycznych oraz ich głównych składników. Przesunięcia chemiczne skalowano wobec sygnałów pochodzących od protonów CHCl_3 ($\delta\text{H} = 7,26$).



Rys. 1. Widmo ^1H NMR olejku z szalwii lekarskiej.



Rys. 2. Widmo ¹H NMR olejku z szalwii lekarskiej z przypisanymi sygnalami głównych składników.

Badania biologiczne

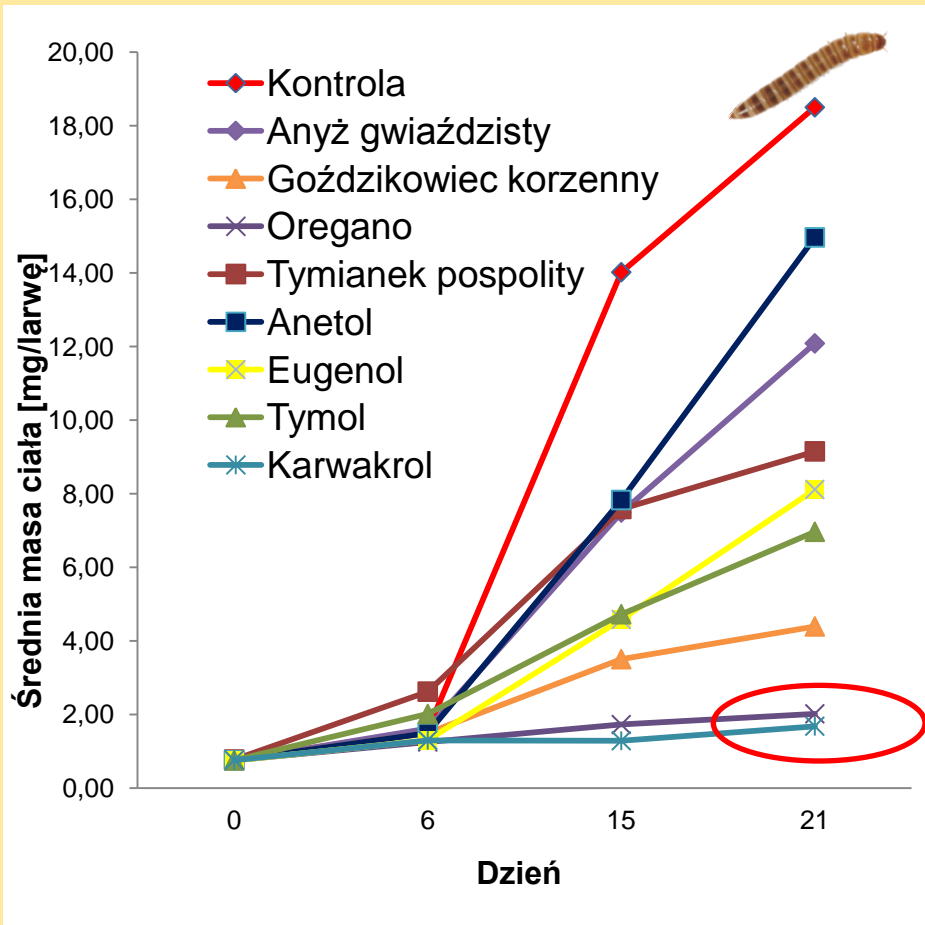
Badania nad aktywnością insektycydalną olejków eterycznych i ich komponentów wobec pleśniakowca lśniącego

- 1. Wpływ wybranych olejków eterycznych i ich głównych komponentów na wzrost i rozwój populacji *A. diaperinus***
- 2. Ocena właściwości deterentnych/atraktantnych**
- 3. Histopatologia jelita środkowego**
- 4. Aktywność enzymów trawiennych**

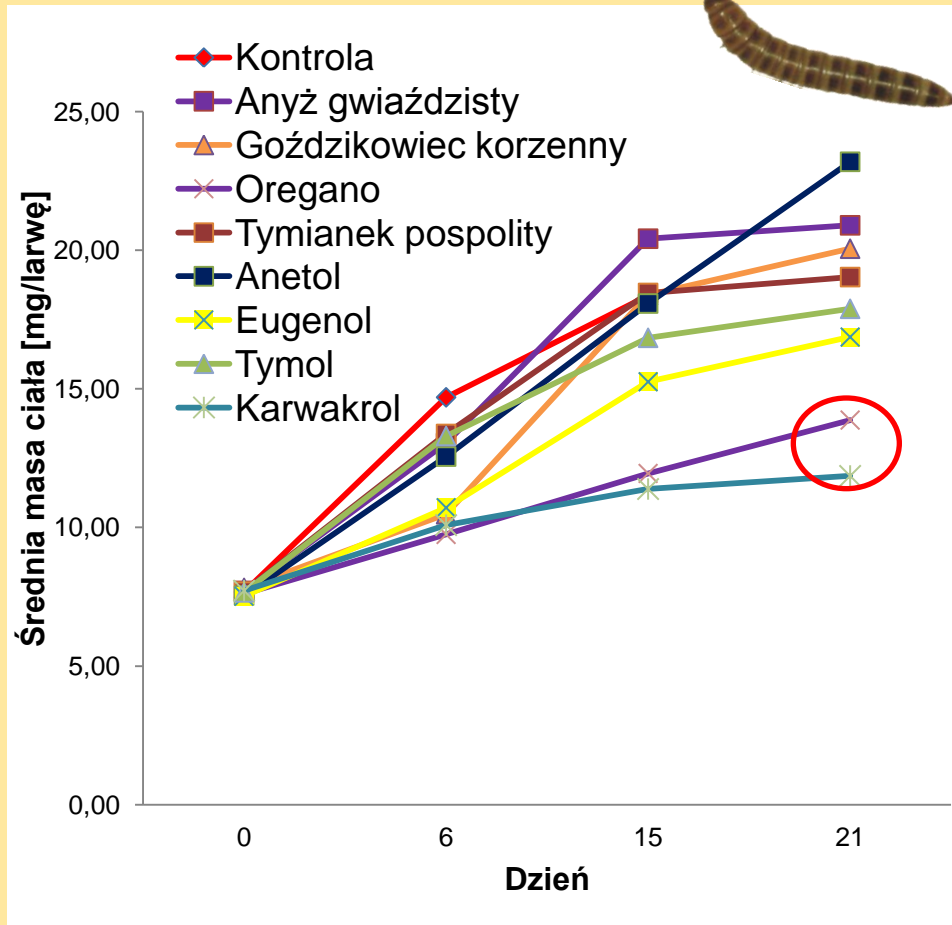
Wyniki badań biologicznych

Wpływ wybranych olejków eterycznych i ich głównych komponentów na wzrost i rozwój populacji *A. diaperinus*





Rys. 3a



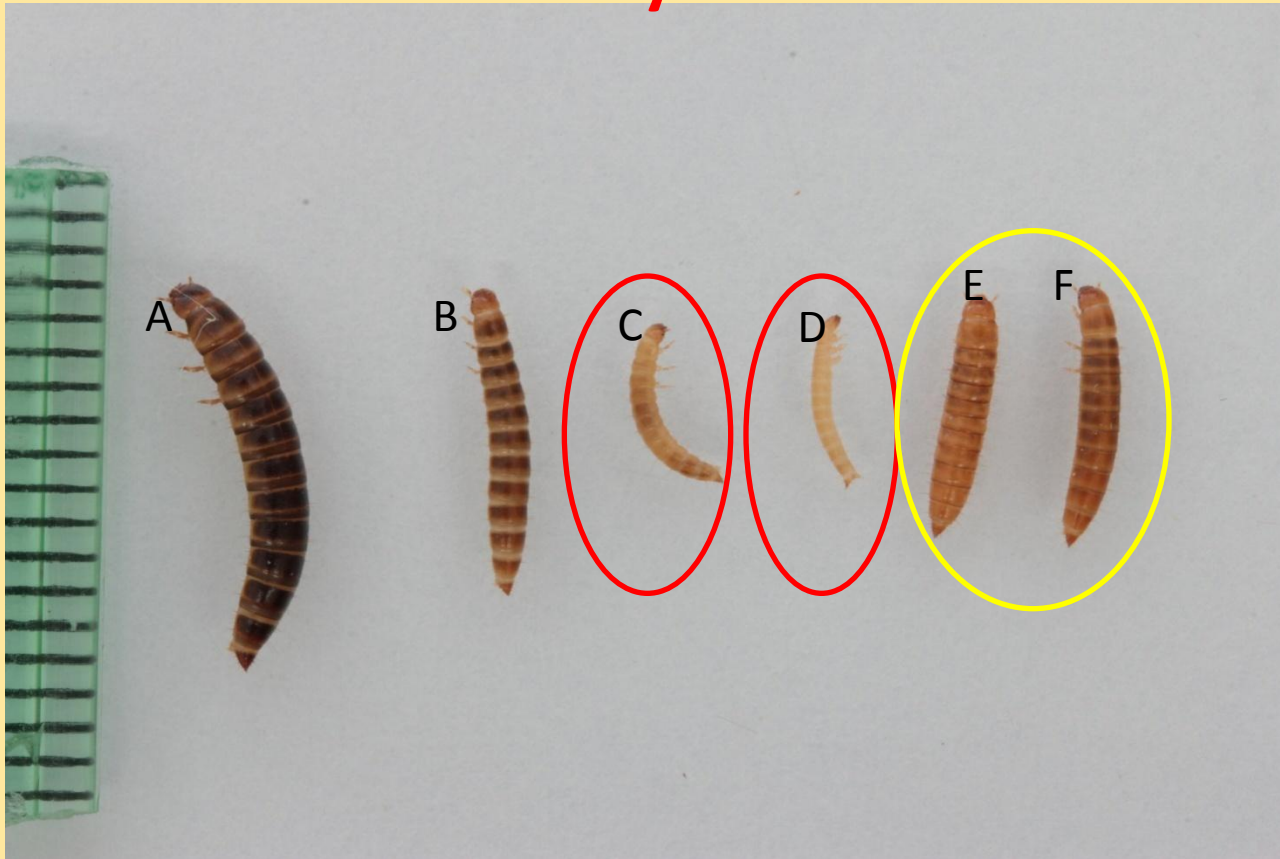
Rys. 3b

Rys. 3. Wpływ olejków eterycznych bogatych w związki fenolowe lub ich pochodne na wzrost: a) larw 10-cio dniowych *A. diaperinus* b) 20-dniowych *A. diaperinus*

Tab. 3. Śmiertelność larw 10-cio i 20-dniowych pod wpływem olejków eterycznych i ich głównych komponentów

Związek	Śmiertelność larw [%]	
	10-dniowe	20-dniowe
Kontrola	5,0	10,0
Żywotnik zachodni (liście)	67,5	30,0
α - Tujon	57,5	37,5
Wrotycz pospolity (liście, kwiaty)	50,0	17,5
β - Tujon	47,5	22,5
Szałwia lekarska (PL)	35,0	30,0
Szałwia lekarska (H)	40,0	35,0
Bylica piołun (susz liście)	22,5	25,0
Anyż gwiaździsty (owoce)	67,5	40,0
Anetol	45,0	55,0
Goździkowiec korzenny (pączki kwiatowe)	60,0	45,0
Eugenol	65,0	67,5
Tymianek pospolity (ziele)	42,5	27,5
Tymol	62,5	22,5
Oregano subs. hirtum (liście)	82,5	55,0
Karwakrol	97,5	77,5
Eukaliptus właściwy (liście)	50,0	37,5
Eukaliptol	72,5	12,5
Barszcz mantegazyjski (korzenie)	47,5	25,0
p-Cymen	30,0	17,5
γ - Terpinen	35,0	17,5

Parametry wzrostu



Fot. 1. Larwy młodsze po 14-stu dniach trwania eksperymentu

- A- Kontrola: 20,6 mg (13mm)
- B- Eugenol 1%: 7,2 mg (9mm)
- C- Oregano 1% : 1,9 mg (6mm)
- D- Karwakrol 1%: 1,5 mg (6mm)
- E- Oregano 0,5% : 4,8 mg (8mm)
- F- Karwakrol 0,5 % : 4,8 mg(8mm)

Co było przyczyną ograniczenia wzrostu?

Badania nad mechanizmami działania olejków eterycznych wobec pleśniakowca lśniącego

- ❖ Ocena właściwości deterentnych/atraktantnych
- ❖ Histopatologia jelita środkowego
- ❖ Aktywność enzymów trawiennych

Tab. 4. Ocena właściwości antyfidantnych wybranych związków

Związek	Współczynniki deterentności								
	10-dniowe larwy			20-dniowe larwy			Imago		
	A	R	T	A	R	T	A	R	T
Olejek żywotnik zachodni	25.34	6.30	31.64	9.47	3.85	13.31	66.21	37.37	103.58
α-Thujone	-67.76	-64.51	-132.27	-8.64	24.10	15.45	41.16	41.66	82.81
Olejek goździkowy	2.95	21.23	24.19	-14.66	87.85	73.19	64.10	48.52	112.62
Eugenol	10.92	32.89	43.80	82.22	45.78	128.00	69.71	32.99	102.70
Olejek tymiankowy	42.13	50.04	92.17	-6.11	79.92	73.81	77.90	9.74	87.64
Tymol	37.54	45.73	83.27	-18.21	78.97	60.76	77.84	53.15	130.99
Olejek oregano	24.9	54.01	78.92	-12.07	77.08	65.01	67.66	67.36	135.02
Karwakrol	28.80	54.08	82.88	2.08	82.90	84.98	82.40	83.12	165.51

$$R = \frac{K-E}{K+E} \times 100$$

$$A = \frac{KK - EE}{KK + EE} \times 100$$

$$T = A + R$$

$T \leq 0$

atraktant

$0 \leq T \leq 50$

słaby deterent

$51 \leq T \leq 100$

deterent średniej mocy

$101 \leq T \leq 150$

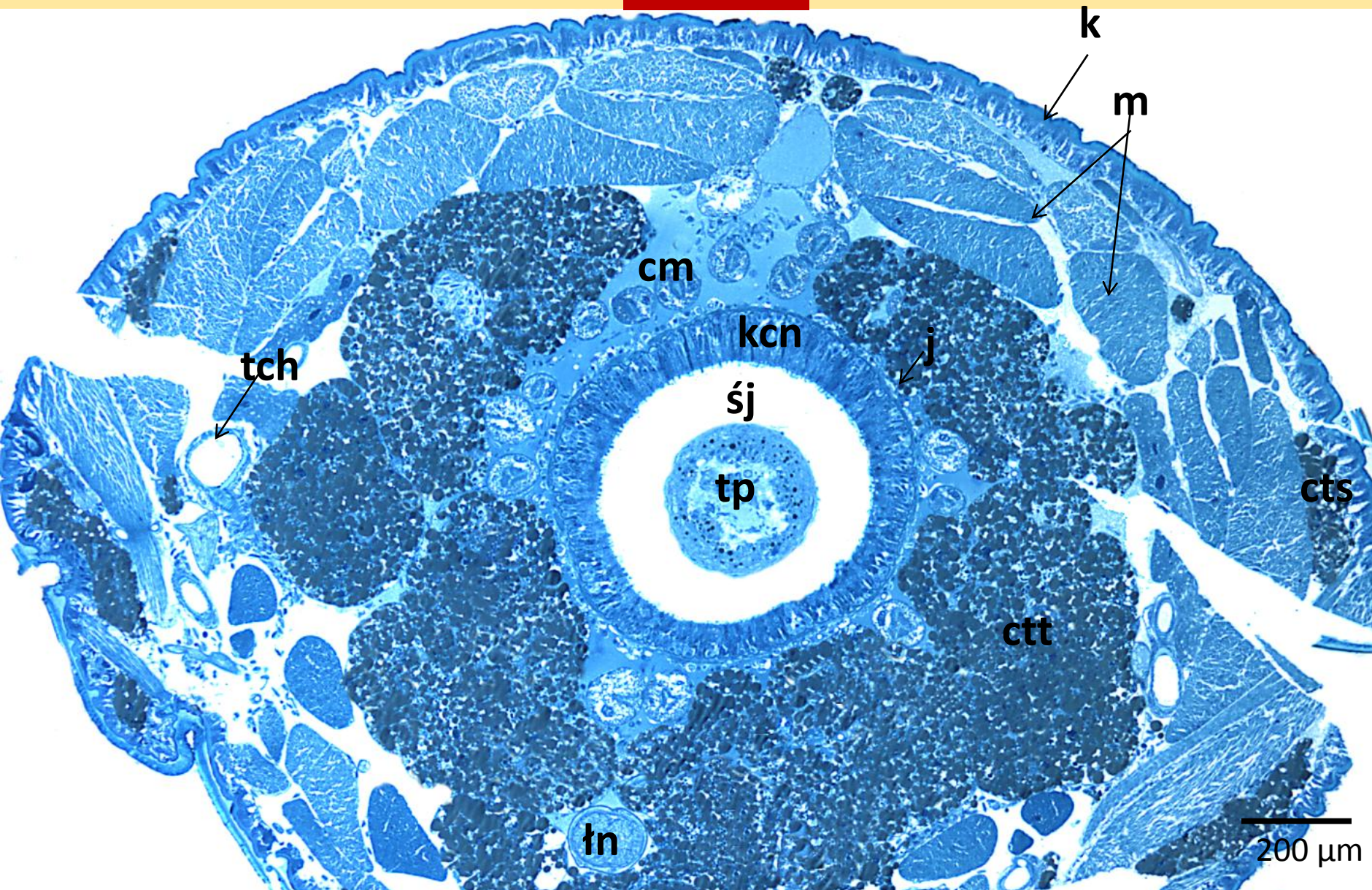
dobry deterent

$151 \leq T \leq 200$

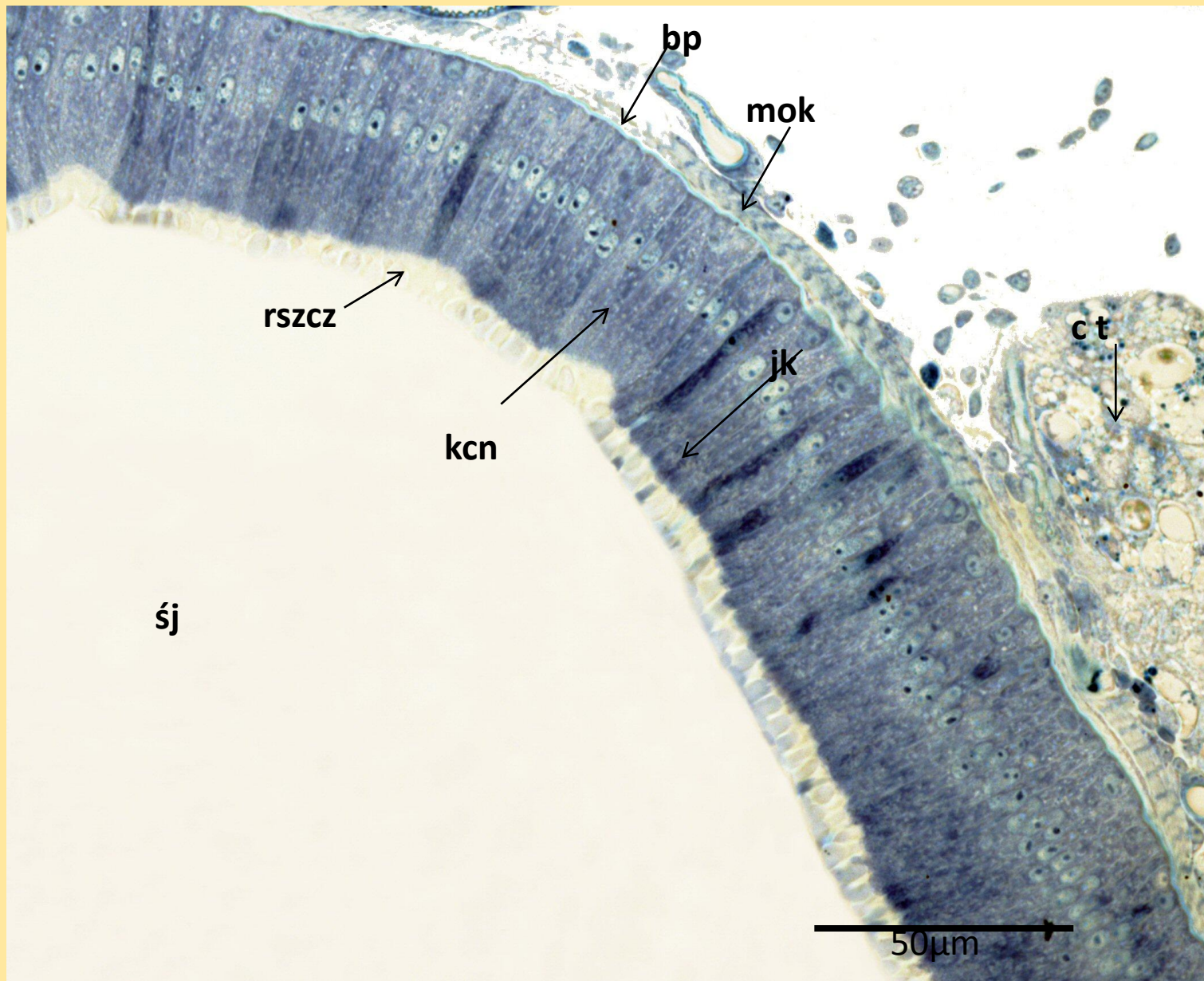
bardzo dobry deterent

Badania histologiczne

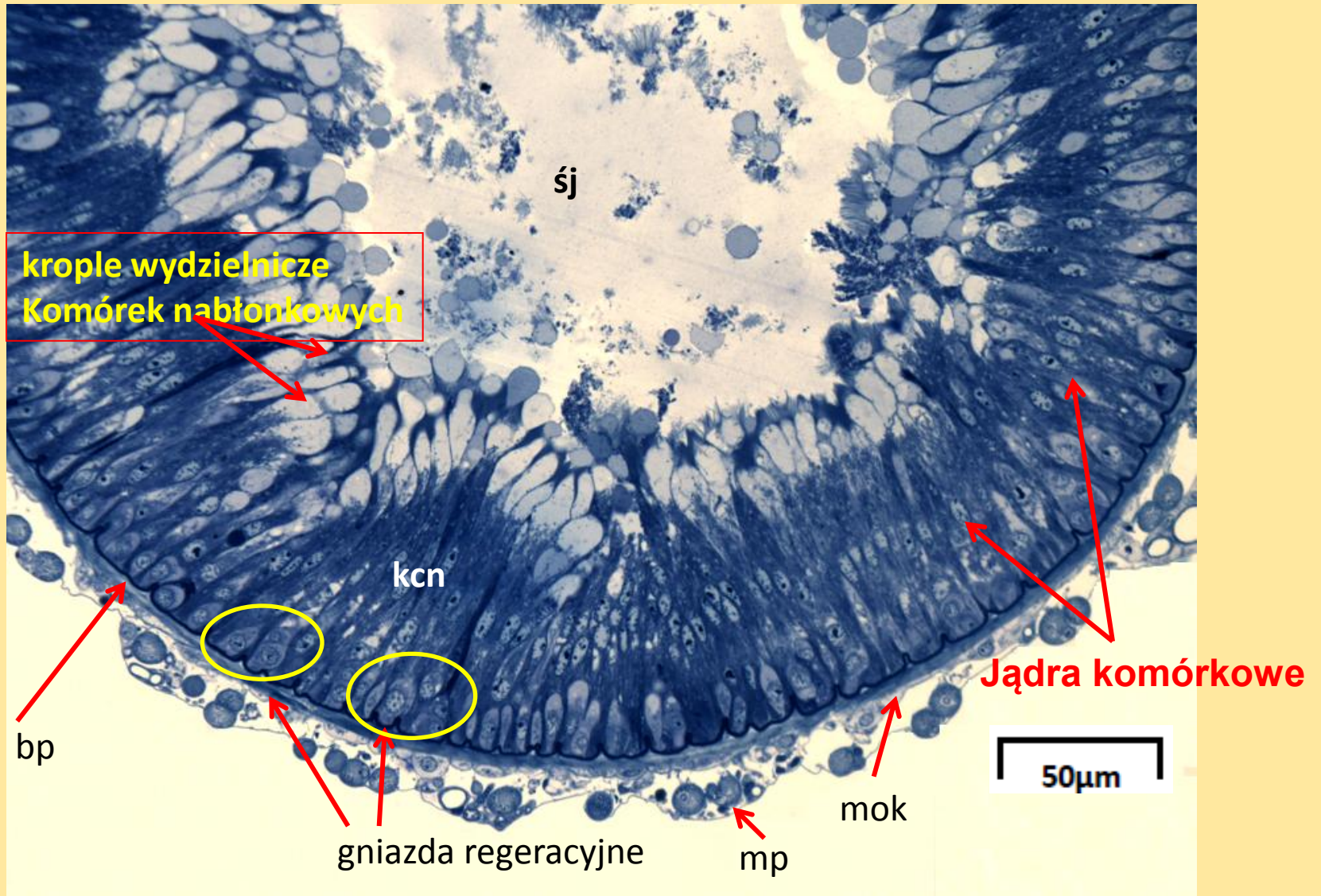
Histopatologia jelita środkowego



Fot.2. Przekrój poprzeczny przez larwę kontrolną *A. diaperinus*: k-kutikula, śj-światło jelita; j-jelito; tp-treść pokarmowa; m-mięśnie szkieletowe; ctt-ciało tłuszczowe, warstwa trzewiowa; cts-ciało tłuszczowe; warstwa ścienna; cm-cewki Malphigiego; tch-tchawka; ln-łańcuszek nerwowy (x 10).

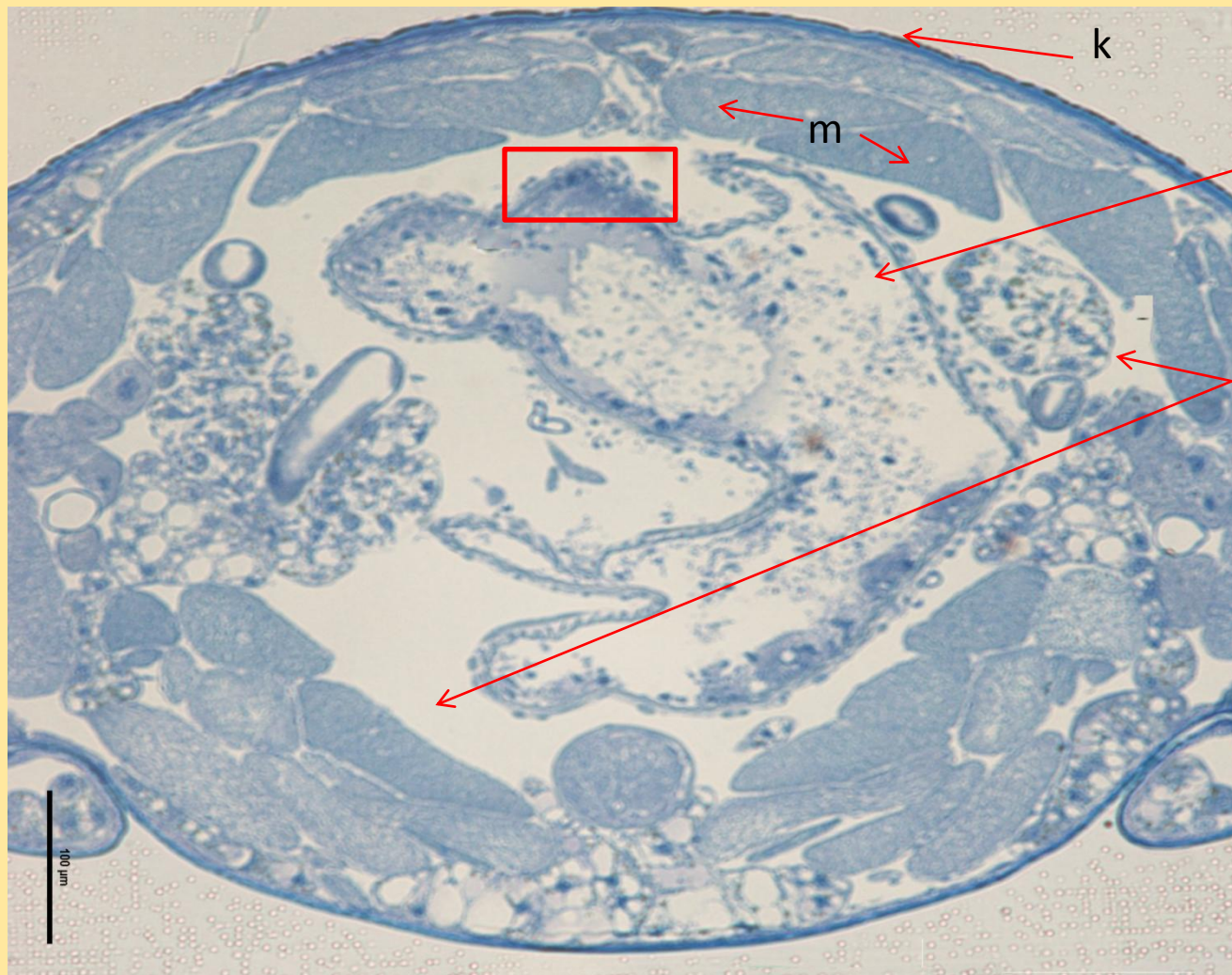


Fot.3. Fragment przekroju poprzecznego przez jelito środkowe larwy kontrolnej *A. diaperinus*: śj-światło jelita; bp-błona podstawna; kcn-komórki cylindryczne nabłonka; jk-jądro komórkowe; ct-ciało tłuszczowe; rszcz-rąbek szczoteczki (x 40).



Fot. 4 Przekrój poprzeczny przez jelito środkowe larwy kontrolnej *A. diaperinus*

śj- światło jelita; kcn- komórki cylindryczne nabłonka; jk-jądro komórkowe; bp- błona podstawna; mok- warstwa mięśni okrężnych; mp-mięśnie podłużne

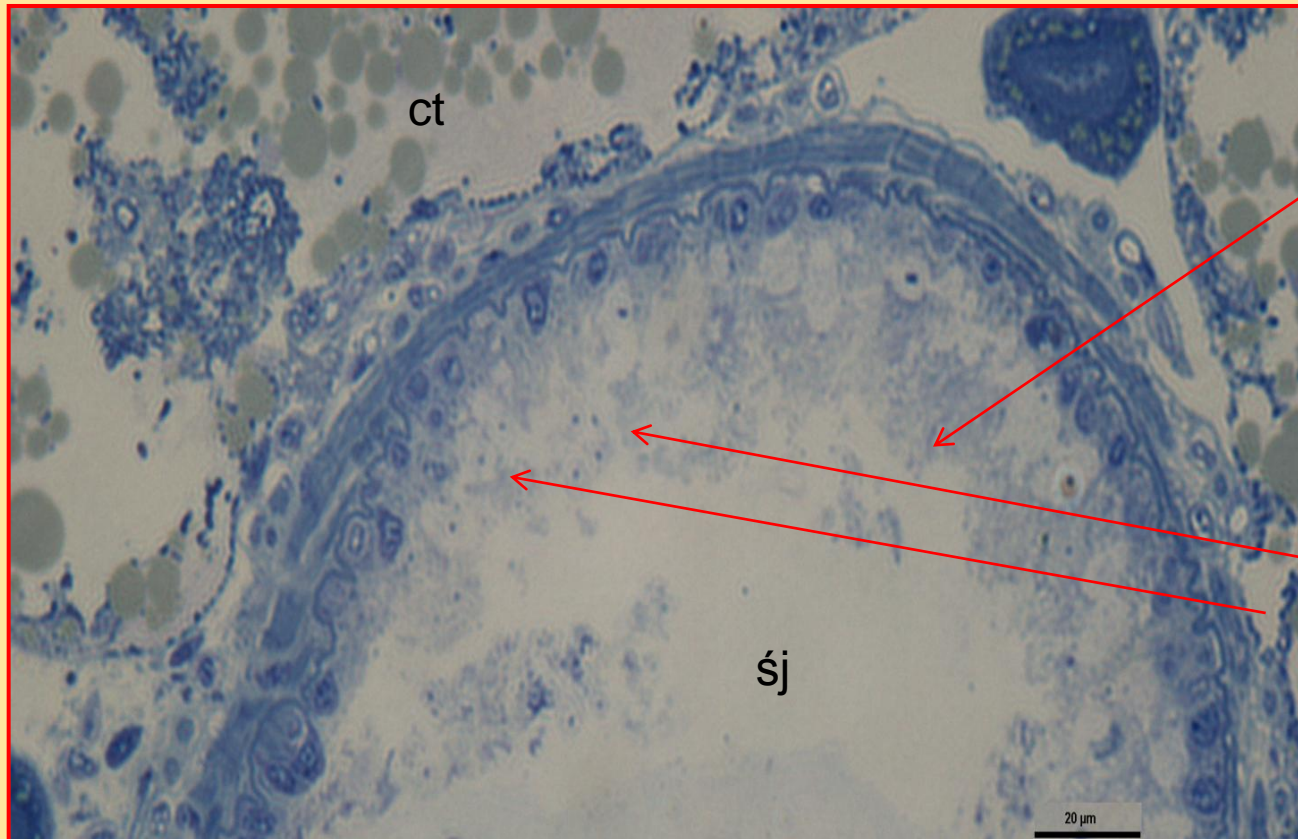


Zniszczona struktura nabłonka

Wakuolizacja i zanik ciała tłuszczowego

Fot. 5. Przekrój przez ciało larwy *A. diaperinus* traktowanej 1% roztworem olejku z *Oregano vulgare* subs. *hirtum*.

k-kutikula; m-mięśnie



- Komórki nabłonkowe uległy rozpadowi

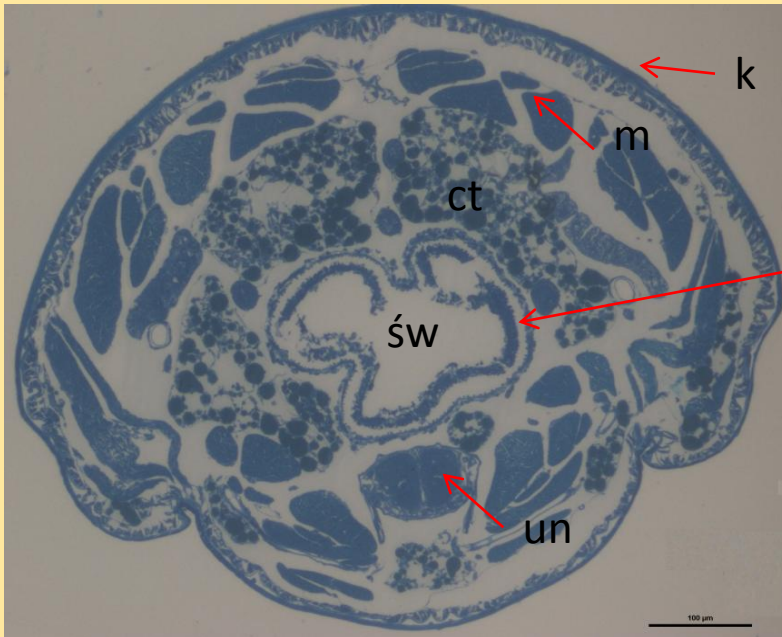
- Jądra komórkowe rozrzucone w świetle jelita

Fot. 6. Fragment jelita środkowego larwy *A. diaperinus* traktowanej 1% roztworem olejku z *Oregano vulgare* subs. *hirtum*.

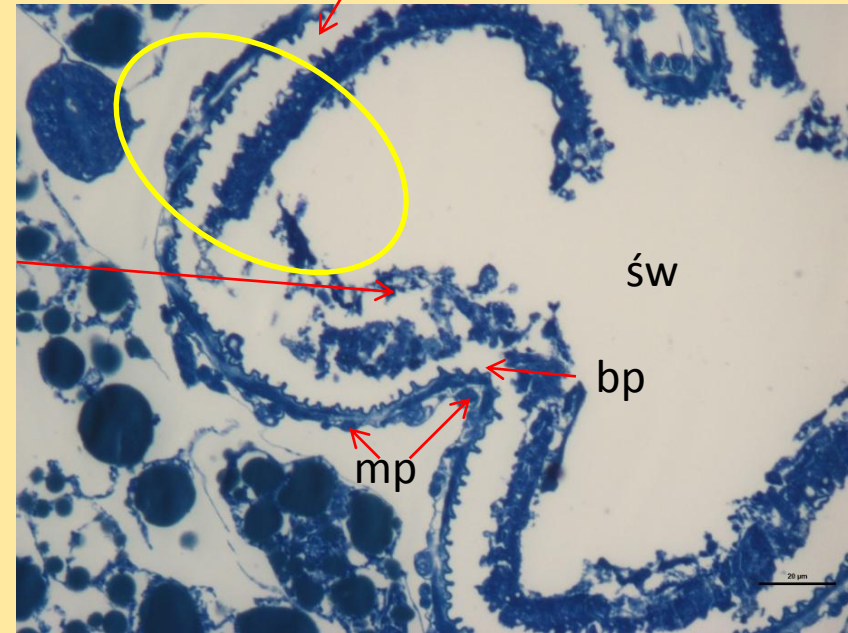
śj- światło jelita; ct-ciało tłuszczowe

Wpływ karwakrolu na strukturę jelita środkowego

Zniszczony nabłonek jelitowy, odklejony od błony podstawnej



Fot. 7. A

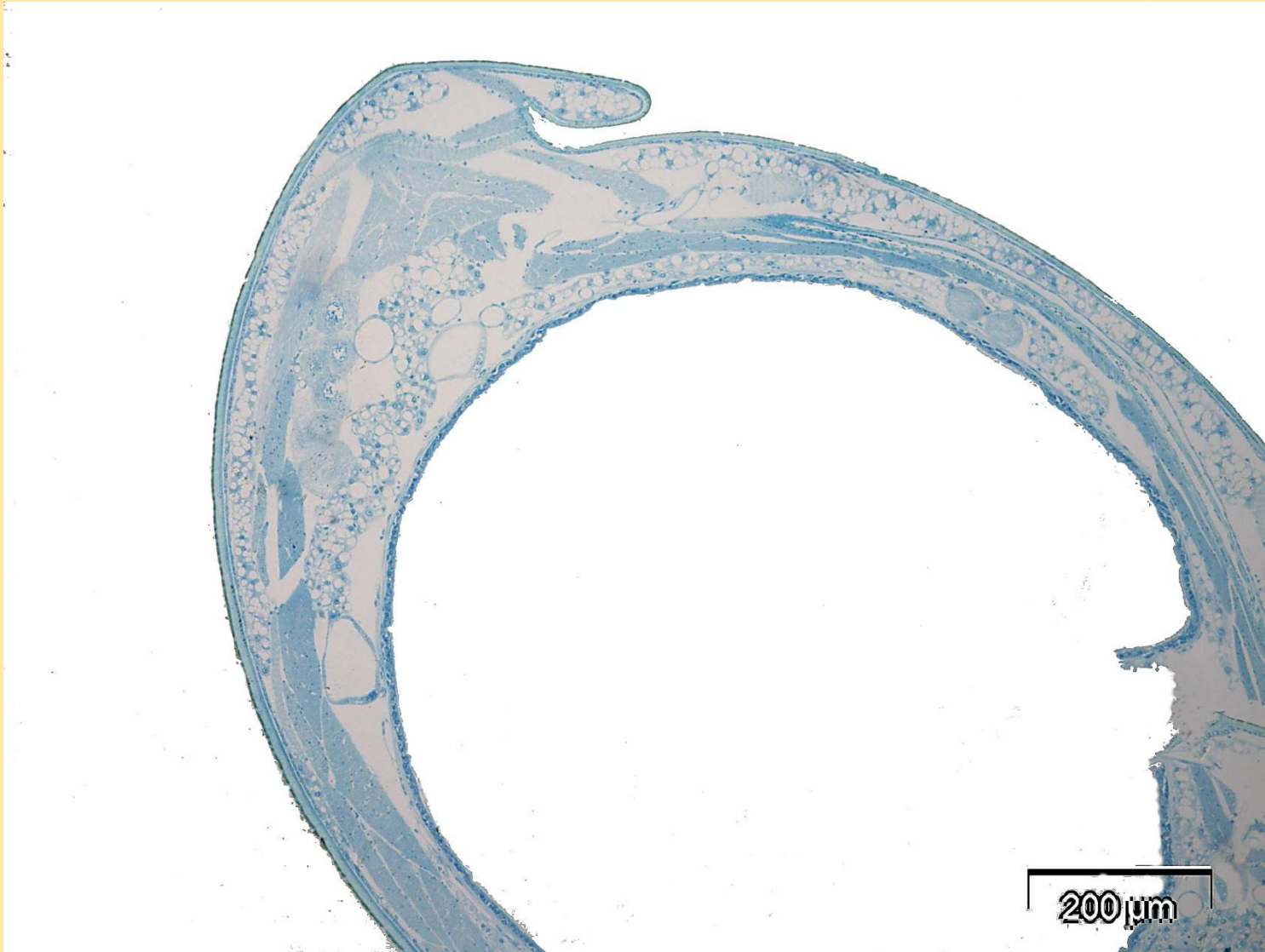


Fot. 7. B

A- przekrój przez larwę *A. diaperinus* traktowaną 1% roztworem karwakrolu

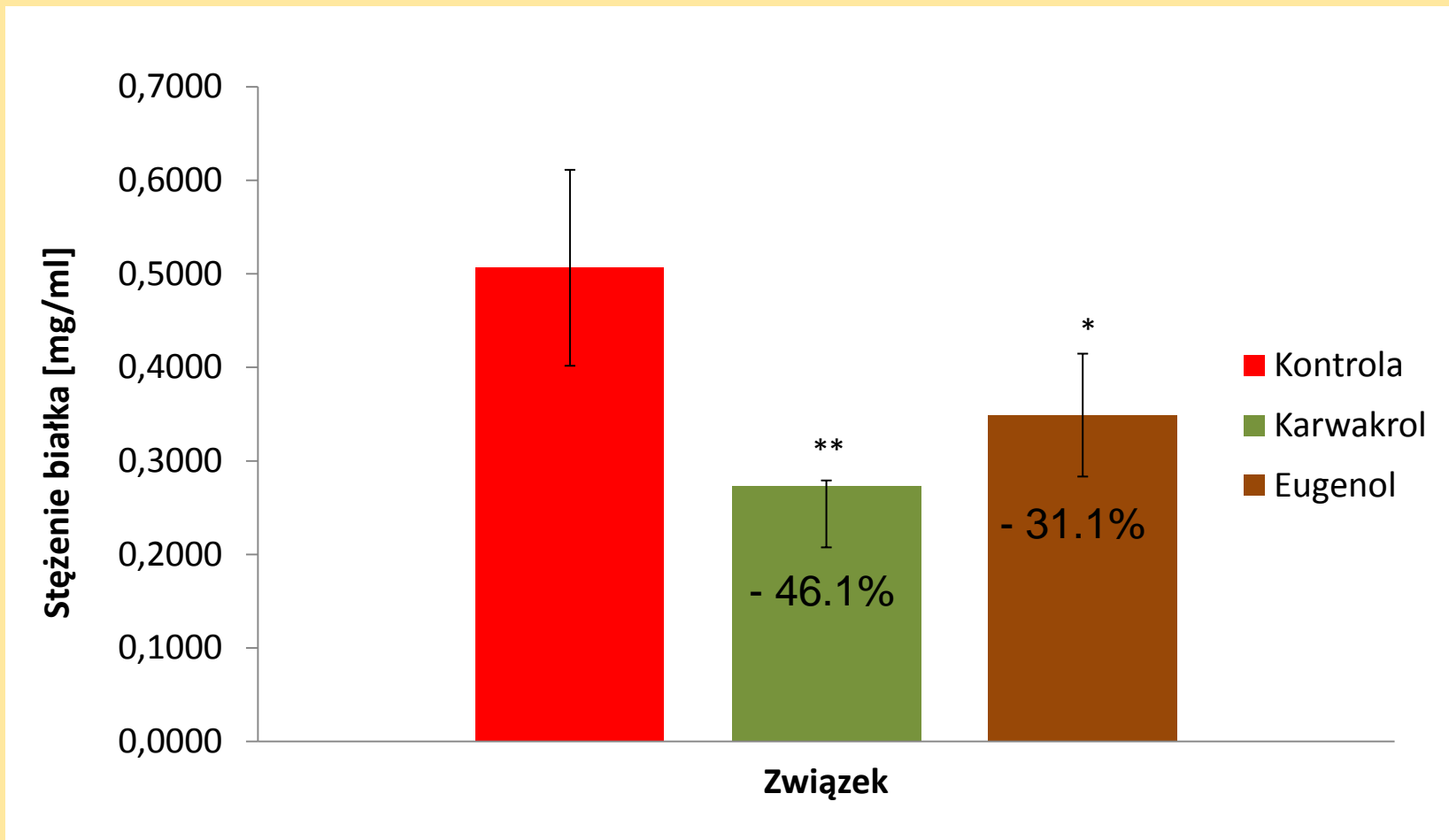
B- fragment jelita środkowego larwy *A. diaperinus* traktowanej 1% roztworem karwakrolu

nj- uszkodzony nabłonek jelita; m-mięśnie; k- kutikula; św- światło jelita; mp- mięśnie podłużne; ct-ciało tłuszczowe

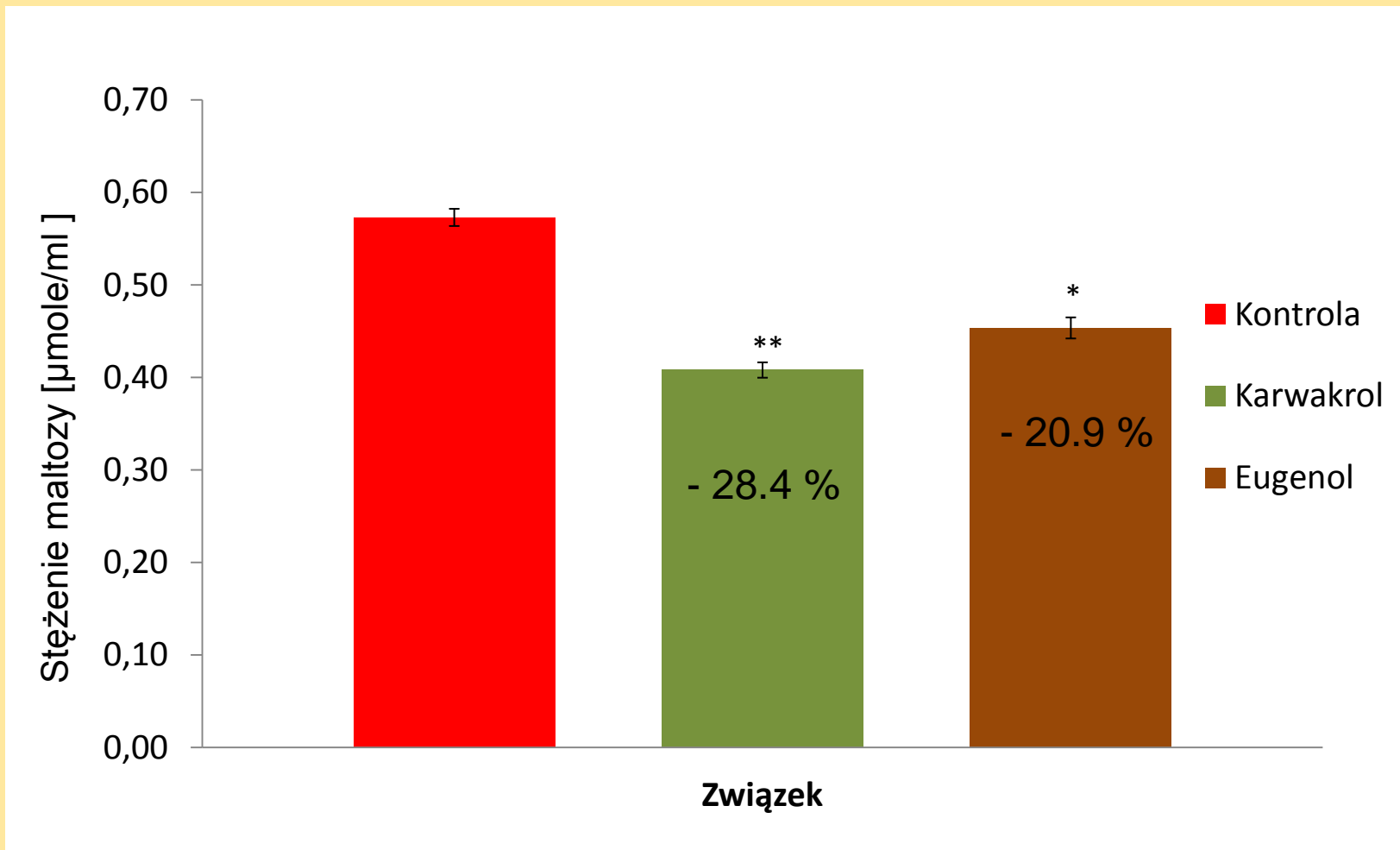


Fot. 7 Przekrój przez larwę *A. diaperinus* traktowaną 1% roztworem Karwakrolu+ Eugenolu

Badania enzymatyczne



Rys. 5. Stężenie białka w próbach z jelit owadów traktowanych pokarmem



Rys. 6. Stężenie α -amylazy w próbach z jelit owadów traktowanych pokarmem

Podsumowanie

❖ Wysoką aktywność insektycydalną wobec obu stadiów larwalnych wykazywał olejek z oregano, karwakrol oraz eugenol. Substancje te silnie hamowały wzrost, wydłużały cykl rozwojowy, powodowały zaburzenia w metamorfozie oraz wysoką śmiertelność obu stadiów larwalnych. Olejek z żywotnika zachodniego i z goździkowca korzennego oraz tymol i eukaliptol wpływały na wysoką śmiertelność wśród młodszych larw.

❖ Ocena właściwości antyfidantnych wybranych związków pokazała, że dorosłe osobniki *A. diaperinus* odznaczają się wyższą wrażliwością sensoryczną w porównaniu z larwami. Najwyższe wartości współczynników deterentności otrzymano dla tymolu i karwakrolu oraz olejku z oregano

❖ Olejek z oregano, karwakrol oraz eugenol powodują silne zmiany histopatologiczne w jelicie środkowym larw *A. diaperinus*. Uszkodzona struktura jelita środkowego uniemożliwia prawidłowe trawienie i przyswajanie pokarmu przez owady.

❖ Ekstrakty roślinne wpływają na aktywność enzymów trawiennych. Karwakrol i eugenol obniżyły aktywność α -amylazy. U owadów hodowanych na diecie zawierającej terpeny obserwowano również spadek zawartości białka w porównaniu z próbami kontrolnymi, co było przyczyną ich słabszego wzrostu.

❖ Liczebność następnej generacji owadów hodowanych na traktowanym pokarmie jest niższa w stosunku do prób kontrolnych. Najmniejszą liczbę powstałych larw obserwowano w próbach hodowanych wcześniej na pokarmie wzbogaconym olejkiem z goździkowca korzennego.

❖ **Z przeprowadzonych badań wynika**, iż w praktyce możliwe zastosowanie znaleźć mogą terpeny takie jak karwakrol i eugenol, a także bogaty w karwakrol, olejek z oregano. Znaczną redukcję liczebności młodszych larw można osiągnąć po zastosowaniu tymolu i eukaliptolu oraz olejku z żywotnika zachodniego i goździkowca korzennego.

❖ Związek o silnych właściwościach atraktantnych, taki jak α -tujon stosowany łącznie z insektycydem poprzez wzrost poziomu żerowania może wpłynąć na obniżenie dawek stosowanych insektycydów.

Projekt realizowany w ramach:

- Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich Matematyczno-Przyrodniczych w ramach projektu pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki (nr projektu POKL.04.01.01-00-081/10)
- projektu "Krok w przyszłość - stypendia dla doktorantów" realizowanego przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego we współpracy z uczelniami wyższymi z regionu w ramach 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007-2013.
- Kapitał Ludzki.



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki
Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Krok
w przyszłość
stypendia dla doktorantów
W edycja



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



WOJEWÓDZTWO
KUJAWSKO-POMORSKIE

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Dziękuję za uwagę ...

