

Gliwice, 31.03.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Litwin,
pt. **Mechanizmy oporności grzybów entomopatogennych na insektycydy z grupy pyretroidów**
promotor: dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ

1. Charakterystyka rozprawy doktorskiej i ocena jej układu i zastosowanego piśmiennictwa

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Litwin została wykonana w oparciu o materiały przesłane przez Panią prof. dr hab. Agnieszkę Marczak, Przewodniczącą Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne. Dysertacja została zaprezentowana w formie jednotematycznego cyklu 3 wieloautorskich publikacji o łącznej wartości 380 punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki i 26,41 punktów Impact Factor. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej opublikowano w latach 2020-23. Prace te, wyszczególnione poniżej, zostały omówione w formie polskojęzycznego autoreferatu o wspólnym tytule „Mechanizmy oporności grzybów entomopatogennych na insektycydy z grupy pyretroidów”:

1. Litwin A., Nowak M., Różalska S. February 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 19,23-42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
2. Litwin A., Bernat P., Nowak M., Słaba M., Różalska S. October 2021. Lipidomic response of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to pyrethroids. *Scientific Reports*, vol. 11, 21319. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00702-y>
3. Litwin A., Mironenka J., Bernat P., Soboń A., Różalska S. January 2023. Accumulation of pyrethroids induces changes in metabolism of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*—Proteomic and lipidomic background. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 249, 114418. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114418>.

Tytuł pracy doktorskiej odpowiada jej zawartości merytorycznej. Autoreferat obejmuje informacje o źródłach finansowania, listę publikacji wchodzących w skład dysertacji ze wskazaniem ich danych bibliometrycznych, wprowadzenie, cele pracy, materiały i techniki wykorzystanie podczas realizacji rozprawy doktorskiej, opis realizacji poszczególnych celów pracy oraz wnioski i stwierdzenia końcowe. Ponadto, praca zawiera streszczenie, abstract, informacje o całkowitym dorobku

naukowym Doktorantki, spis literatury oraz pełne teksty artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z oświadczeniami autorów publikacji o ich wkładzie w powstanie tych dzieł. Konstrukcja pracy doktorskiej jest typowa dla prac tego typu i oceniam ją pozytywnie. Lista piśmiennictwa, na które powołuje się Autorka pracy doktorskiej obejmuje w większości najnowsze pozycje bibliograficzne, publikowane w ostatnich 5 latach od złożenia pracy, a użycie wybranej literatury jest zasadne i merytorycznie uzasadnione.

2. Ocena celów pracy, zastosowanych metod i zaangażowania Doktorantki w realizację pracy doktorskiej

Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było określenie mechanizmów oporności grzyba entomopatogenicznego *Beauveria bassiana* ARSEF 2860, pochodzącego z Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (USA) na insektycydy z grupy pyretroidów - 1-cyhalotrynę, a-cypermetrynę oraz deltametrynę. W ramach tego celu Doktorantka wskazała 7 celów wynikających z celu nadrzędnego:

1. Ocena wpływu pyretroidów na wzrost, aktywność metaboliczną oraz zarodnikowanie *B. bassiana*.
2. Określenie zdolności *B. bassiana* do akumulacji pyretroidów w grzybni.
3. Ocena zmian adaptacyjnych *B. bassiana* wywołanych przez pyretroidy.
4. Określenie zmian zachodzących w profilu fosfolipidowym oraz w zawartości lipidów neutralnych w komórkach *B. bassiana* wywołanych przez pyretroidy.
5. Ocena wpływu pyretroidów na proteom zewnątrzkomórkowy *B. bassiana* oraz aktywność enzymów biorących udział w procesie infekcyjnym grzybów entomopatogenicznych.
6. Określenie wpływu pyretroidów na proteom wewnątrzkomórkowy *B. bassiana*.
7. Ocena poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach *B. bassiana* wywoływanego przez pyretroidy.

Pomimo faktu, że Doktorantka wskazała ogólne oraz szczegółowe cele pracy i w odniesieniu do tych celów opisała wyniki swoich badań, w przygotowanej rozprawie brakuje mi wyraźnie zaznaczonej tezy pracy. Można natomiast założyć, że stosunkowo mało obszerny przegląd literaturowy, stanowiący w autoreferacie podstawę do wskazania wyznaczonych w rozprawie celów badań, wynika z faktu, że Doktorantka w skład rozprawy włączyła pracę przeglądową – Manuskrypt 1, stanowiącą oparte o przegląd literaturowy tło teoretyczne rozwiązywanego problemu badawczego.

W następnej kolejności Doktorantka opisuje wyniki prac badawczych pozostałych dwóch manuskryptów w kontekście postawionych wcześniej celów badawczych pracy doktorskiej. Są one podsumowane i zakończone wspólnymi wnioskami. Odniesienie się wynikami prac badawczych bezpośrednio do celów pracy jest w moim odczuciu słusznym zabiegiem i ułatwia poruszanie się po planie eksperymentu oraz wyciąganie właściwych wniosków. Uważam więc, że takie podejście do kwestii spełnienia założeń pracy doktorskiej częściowo rekompensuje mi brak twardo postawionej tezy pracy. Ponadto, cele pracy oceniam pozytywnie.

W swojej pracy doktorskiej Pani mgr Anna Litwin wykorzystwała szeroki wachlarz nowoczesnych metod badawczych, w tym: spektrofluorymetrię, spektrometrię, chromatografię gazową (GC-MS), chromatografię cieczową (LC-MS/MS), absorpcyjną spektrometrię atomową (AAS), spektrometrię mas MALDI-TOF/TOF, mikroskopię konfokalną, mikroskopię świetlną oraz elektroforezę 1-D i 2-D. Użycie wymienionych metod uważam za właściwe do przeprowadzenia badań w ocenianej pracy doktorskiej i spełnienia jej założeń.

Zaangażowanie Doktorantki w przeprowadzenie eksperymentów oraz przygotowanie publikacji (odpowiednio 65%, 65% i 60% wkładu autorstwa w manuskrypty 1-3) oceniam wysoko. Warto podkreślenia jest jej zaangażowanie w pozyskanie środków na badania w ramach dwóch dotacji celowych na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, jako doświadczenie cenne dla jej dalszego rozwoju naukowego.

3. Ocena wyników pracy doktorskiej oraz proponowane zagadnienia do dyskusji

Uważam, że wyniki uzyskane w ocenianej dysertacji są niezwykle wartościowe i omówione w sposób prawidłowy i merytoryczny. W trakcie czytania pracy napotkałam na kilka zagadnień, które mnie zainteresowały i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej dyskusji:

- na stronie 9 Doktorantka wspomina o oporności stawonogów na zastosowane insektycydy. Ze względu na fakt, że nomenklatura dotycząca zagadnień oporności i odporności często budzi wątpliwość czy Doktorantka mogłaby się pokusić o wyjaśnienie kiedy używamy pojęcia oporność, a kiedy odporność w zagadnieniach związanych z wpływem czynników na organizmy?
- Na stronie 15 Doktorantka pisze, że grzyby mikroskopowe posiadają mechanizmy warunkujące ich przetrwanie w obecności toksycznych zanieczyszczeń. O jakich mechanizmach mowa i czy są to mechanizmy, które dotyczą również badanego w tej dysertacji grzyba entomopatogennego?
- Na stronie 19 napisano: „Ponieważ PC i PE są głównymi fosfolipidami w komórkach *B. bassiana*, dynamika błony komórkowej zależy od ich proporcji, a wzrastający stosunek PC/PE prowadzi do zwiększenia płynności błony komórkowej”. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić co jest konsekwencją takiej zmiany płynności błony komórkowej w kontekście prowadzonych badań?
- Na stronie 25 wspomniano, że białka szoku cieplnego uznawane są za markery stresu oksydacyjnego, ich zawartość wzrasta w obecności substancji toksycznych, a także w warunkach niedoboru tlenu i azotu. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić mechanizm tego zjawiska?
- W dysertacji po raz pierwszy wykazano, że pyretroidy akumulują się w grzybni *B. bassiana* (s. 30). Czy można założyć, że grzyb ten, stosowany już wcześniej w procesach bioremediacji gleb, mógłby być efektywny w bioremediacji gleb rolniczych, w których stwierdzono wysokie stężenia pyretroidów? Czy Doktorantka spotkała się z takim zastosowaniem tego grzyba i być może czy planuje również takie badania bioremediacyjne w przyszłości?

- W tabeli 4 w publikacji 2 przedstawiono dane dotyczące przepuszczalności błony w odpowiedzi na działanie pyretroidów w stężeniu 100 mg/L (s. 74). Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić w jaki sposób interpretować wartości powyżej 100% dla przepuszczalności błony? Jeśli mogłabym również prosić o wyjaśnienie pojęcia odzysku (recovery [%]) - na czym polega w tym kontekście?
- Doktorantka zastosowała w badaniach elektroforezę 1-D oraz 2-D w celu przeprowadzenia rozdzielania białek zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych. Czy mogłabym prosić o krótkie scharakteryzowanie metod i wyjaśnienie dlaczego zastosowano takie odmiany elektroforezy dla tych dwóch grup badanych białek?

4. Ocena zasadności podjętej tematyki badawczej i możliwość praktycznego zastosowania wyników pracy doktorskiej

Problem naukowy, którego rozwiązania podjęła się w recenzowanej rozprawie Doktorantka, dotyczy wyjaśnienia mechanizmów oporności grzyba entomopatogennego *Beauveria bassiana* ARSEF 2860, na insektycydy z grupy pyretroidów - l-cyhalotrynę, a-cypermetrynę oraz deltametrynę. Prace badawcze opisane w recenzowanej pracy doktorskiej miały za zadanie zarówno obszernie scharakteryzować zmiany zachodzące w grzybie *B. bassiana* w odpowiedzi na kontakt z pyretroidami, jak i w oparciu o te informacje zaproponować potencjalne mechanizmy oporności badanego mikroorganizmu na wspomniane wyżej insektycydy. Temat biologicznej ochrony roślin, możliwy z użyciem grzybów entomopatogennych jako alternatywy dla chemicznych insektycydów to zagadnienie niezwykle ważne w kontekście produkcji rolniczej i ochrony środowiska. Tematyka ta wpisuje się więc w aktualne trendy rozwoju nie tylko nauk biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem mykologii oraz szerzej, w zagadnienia biotechnologii rolniczej i środowiskowej. Dlatego też zasadność przyjętej tematyki badawczej oceniam pozytywnie.

Badania przeprowadzone w ramach realizacji pracy doktorskiej dostarczyły dowodów na zdolność pyretroidów do akumulacji w grzybni entomopatogennego grzyba *B. bassiana*. Wykazano, że zakumulowane pyretroidy, nawet w stosunkowo niskich stężeniach, wywierają negatywny wpływ na kondycję badanego mikroorganizmu, a także przedstawiono możliwe mechanizmy oporności *B. bassiana* na przebadane związki toksyczne. Uważam, że wskazanie możliwych mechanizmów takiej oporności stanowi znaczący krok w kierunku umożliwienia zastosowania praktycznego *B. bassiana* jako efektywnej alternatywy dla chemicznych środków owadobójczych.

5. Podsumowanie i końcowa ocena pracy

Doktorantka przedstawiła do oceny cykl 3 jednotematycznych publikacji naukowych. Prace te są wynikiem obszernego przeglądu teoretycznego oraz badań laboratoryjnych, tworzących logiczną całość i spełniających wykazane na początku pracy cele badawcze. W moim odczuciu recenzowana przeze mnie praca doktorska Pani mgr Anny Litwin stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, postawione na początku realizacji pracy. W autoreferacie Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów językowych, interpunkcyjnych i edycyjnych, które jednak w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej stronie pracy i z reguły są nieuniknione.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka sformułowała szereg wniosków, z których w moim odczuciu najważniejszymi są:

- Pyretroidy w stężeniu 50 mg/L hamują wzrost i zdolność do zarodnikowania *B. bassiana*. Badane substancje nie wywierają natomiast negatywnego wpływu na aktywność metaboliczną ani nie powodują zmian morfologicznych grzybni tego grzyba entomopatogennego. W obecności a-cypermetryny w stężeniu 5 mg/L zaobserwowano nadprodukcję białek biorących udział w organizacji cytoszkieletu aktywnego oraz enzymów szlaków metabolicznych, co może być mechanizmem obronnym *B. bassiana* umożliwiającym przetrwanie w niesprzyjających warunkach.
- Jednym z mechanizmów oporności *B. bassiana* na pyretroidy jest nadprodukcja białek odpowiedzialnych za wzrost strzępkowy i syntezę ściany komórkowej, co umożliwia naprawę uszkodzonych ścian komorkowych.
- Badany drobnoustrój w odpowiedzi na obecność pyretroidów produkuje białka chroniące go przed konsekwencjami wpływu tych substancji. W obecności a-cypermetryny zaobserwowano nadprodukcję białek zaangażowanych w metabolizm związków azotowych. Enzymy te biorą udział w ochronie organizmów przed toksycznym wpływem związków azotowych podczas stresu nitrozacyjnego oraz prawdopodobnie przekształcają obecną w cypermetrynie grupę cyjankową. Dodatek a-cypermetryny powodował także nadprodukcję białek biorących udział w organizacji cytoszkieletu aktywnego, co może tłumaczyć brak zmian morfologicznych w strzępkach tego grzyba. W obecności deltametryny wykazano wzrost produkcji dehydrogenazy alkoholowej odpowiadającej za metabolizm różnych substancji toksycznych. Przeprowadzone analizy proteomiczne *B. bassiana* wykazały, że zakumulowane pyretroidy wpływają także na enzymy zaangażowane w główne szlaki metaboliczne oraz zaburzają działanie mitochondriów, odpowiedzialnych za produkcję ATP.

6. Konkluzja końcowa

Przedstawiona do oceny dysertacja potwierdza umiejętności Doktorantki w zakresie samodzielnego planowania i realizacji badań naukowych oraz ich opracowania, podsumowywania i efektywnego publikowania w czasopismach naukowych w oparciu o posiadaną przez Doktorantkę wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne. Uważam, że dysertacja ma wysoki poziom, jest merytoryczna i wskazuje na możliwość praktycznego zastosowania uzyskanych w niej wyników w szeroko pojętych naukach biologicznych i biotechnologii. Nie mam wątpliwości, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Litwin pt. Mechanizmy oporności grzybów entomopatogennych na insektycydy z grupy pyretroidów spełnia warunki wskazane w art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). Wnoszę więc o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim w dyscyplinie nauki biologiczne na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Jednocześnie ze względu na szeroki zakres opisanych w dysertacji badań, opublikowanych w wysokopunktowanych czasopismach, z wysokim wkładem Doktorantki w ich autorstwo oraz potencjał aplikacyjny wyników uzyskanych w ocenianej dysertacji wnoszę Rady Dyscypliny o wyróżnienie recenzowanej przez mnie pracy doktorskiej.

A. Kębłowski-Buczyński