

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz
Katedra Mikrobiologii, Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Lwowska 1, 87-100 Toruń
Tel. +48 (56) 611-25-40
E-mail: hrynk@umk.pl

Toruń 18.04.2023

Podstawa formalna opinii

Opinia została sporządzona dla Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 21 lutego 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Katarzyny Litwin

p.t. „Mechanizmy oporności grzybów entomopatogennych na insektycydy z grupy pyretroidów”

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora
w dyscyplinie nauki biologiczne

Recenzja została przygotowana w oparciu o wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr Anny Katarzyny Litwin do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Katarzyny Litwin została napisana pod kierunkiem dr hab. Sylwii Różalskiej, prof. UŁ (pełniącej rolę promotora), w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Badania naukowe zaprezentowane w rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane z funduszy projektu OPUS12 pt. „Określenie potencjału infekcyjnego grzybów entomopatogennych w obecności insektycydów chemicznych” (2016-2023) przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki (2016-2023; NCN 2016/23/B/NZ9/00840, kierownik projektu: dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ) oraz 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 pt. „Oznaczenie markerów stresu oksydacyjnego u grzybów entomopatogennych traktowanych insektycydami z grupy pyretroidów” i „Określenie wpływu insektycydów z grupy pyretroidów na grzyby entomopatogenne” (kierownik projektów: A. Litwin; kody projektów: B1811000001838.02 i B1911000002156.02).

Struktura pracy jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim i składa się z trzech spójnych tematycznie prac naukowych opublikowanych w renomowanych i wysoko punktowanych czasopismach naukowych, które ukazały się w latach 2020-2023: **(P1)** Reviews in Environmental Science and Bio/Technology (IF₂₀₂₁ = 14.284; punkty MEiN = 140; 48 cytowań) [<https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>]; **(P2)** Scientific Reports, vol. 11, 21319 (IF₂₀₂₁ = 4.997; punkty MEiN = 140; 3 cytowania) [<https://doi.org/10.1038/s41598-021-00702-y>]; **(P3)** Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 249, 114418 (IF₂₀₂₁ = 7.129; IF_{5-letni} = 7.284; punkty MEiN = 100; brak cytowań) [<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114418>]. Sumaryczny IF powyższych prac wynosi 26.41, natomiast łączna liczba punktów MEiN 380. We wszystkich tych publikacjach Pani mgr A. Litwin jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej wiodącą rolę w planowaniu i realizacji doświadczeń, analizie danych oraz przygotowaniu podstawowej wersji manuskryptów. Potwierdzają ten fakt oświadczenia dołączone do pracy doktorskiej, w których uszczegółowiono zakres prac wykonanych przez Doktorantkę oraz wskazano procentowy udział: 60-65%.

W rozprawie, poza wymienionymi powyżej pracami naukowymi, Doktorantka zamieściła dodatkowo takie rozdziały jak: Wprowadzenie, Cele pracy, Materiały i techniki wykorzystane podczas realizacji rozprawy doktorskiej, Realizacja celów pracy, Wnioski i stwierdzenia końcowe, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury. W rozprawie umieszczono również informacje dotyczące finansowania badań oraz całkowitego dorobku naukowego, co pozwala ocenić ogólny rozwój i ukierunkowanie badań naukowych Doktorantki, jak również oświadczenia współautorów.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie mechanizmów oporności grzyba entomopatogennego *Beauveria bassiana* ARSEF 2860 na insektycydy z grupy pyretroidów (λ -cyhalotrynę, α -cypermetrynę oraz deltametrynę). Szczegółowe cele pracy zostały przez Doktorantkę przedstawione w formie siedmiu punktów (str. 12), które pozwoliły określić szczegółowy zakres badań naukowych podjętych w rozprawie. Wstęp do wyników badań stanowi praca przeglądowa opisująca grzyby entomopatogenne, proces infekcyjny i

zdolności tych mikroorganizmów do usuwania toksycznych zanieczyszczeń oraz możliwości dodatkowego i niekonwencjonalnego ich wykorzystania: P1 (Litwin i in. 2020). Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań opisane zostały szczegółowo i przedyskutowane w 2 eksperymentalnych pracach naukowych: P2 (Litwin i in. 2021) oraz P3 (Litwin i in. 2023).

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Rolnictwo jest niezwykle dynamicznym sektorem, który od zawsze napędzany był technologicznymi innowacjami skierowanymi na maksymalizację wydajności produkcyjnej, która nie tylko zwiększa dochody rolników ale również wpływa na zaspokojenie potrzeb rosnącej populacji świata. Popularyzacja np. nawozów chemicznych lub syntetycznych środków ochrony roślin wpłynęła znacząco na wzrost w uzyskiwanych plonach upraw. Podejście takie wiąże się niestety z poważnymi konsekwencjami dla środowiska i bezpieczeństwa żywieniowego. Znaczący wzrost użytkowania środków agrochemicznych niesie za sobą nie tylko zanieczyszczenie wód gruntowych, niszczenie różnorodności biologicznej, negatywny wpływ na zdrowie publiczne i odżywianie społeczeństwa, ale również wzrost odporności szkodników roślin. Z tego powodu istnieje pilna potrzeba wprowadzenia poważnych zmian w tym zakresie i opracowanie alternatywnych technologii opartych na agroekologii, których priorytetem będzie ochrona i odbudowa ekosystemów oraz bezpieczeństwo żywnościowe.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska, jest odpowiedzią na globalny problem związany z nadmiernym wykorzystywaniem środków ochrony roślin stosowanych w rolnictwie i skupia się na dogłębnym zbadaniu negatywnego wpływu insektycydów na mikroorganizmy oraz wskazuje alternatywne metody, które mogą wpłynąć na obniżenie ich nadmiernego wykorzystywania w rolnictwie.

Insektycydy to powszechnie stosowane w rolnictwie środki do zwalczania owadów, których pozostałości gromadzone są w środowisku naturalnym, zagrażając organizmom żywym. Zbadane przez Doktorantkę pyretroidy są trzecią najczęściej stosowaną grupą insektycydów na świecie. Powszechne stosowanie pyretroidów oraz ich lipofilność i hydrofobowość prowadzą do nagromadzenia ich pozostałości w glebie, wodach powierzchniowych i osadach, przyczyniając się do wzrostu potencjalnego zagrożenia dla funkcjonowania środowiska i zdrowia ludzi. Nadmierne stosowanie syntetycznych środków ochrony roślin doprowadziło do uodpornienia się ponad 500 gatunków stawonogów na jedną lub więcej klas insektycydów. Stosowanie tego typu środków ma również negatywny wpływ na mikroorganizmy glebowe. Bezpieczną alternatywą dla chemicznych insektycydów są grzyby entomopatogenne (bioinsektycydy), które charakteryzują się zdolnością do uśmiercania stawonogów, co czyni je naturalnym czynnikiem kontroli populacji tych organizmów. Proces infekcyjny grzybów entomopatogennych związany jest z ich szczególnymi właściwościami, jak np. możliwością adhezji zarodników do kutikuli, aktywnością enzymów litycznych i białek zwanych hydrofobinami, syntezą metabolitów wtórnych powodujących paraliż i zakłócających procesy fizjologiczne owadów. Do produkcji biopreparatów najczęściej wykorzystywane są gatunki należące do rodzajów *Metarhizium* i *Beauveria*, które charakteryzują się nie tylko szerokim spektrum działania na owady, ale również właściwościami wspomagającymi wzrost roślin (endofity). Powszechnie stosowany w biokontroli entomopatogeny grzyb *Beauveria bassiana*, który stanowi przedmiot niniejszej rozprawy, uznawany jest za jeden z najskuteczniejszych bioinsektycydów. Należy

on do entomopatogenów niespecyficznym (zwalczą owady i roztocza) występujących naturalnie we wszystkich typach gleb i nie stanowi zagrożenia dla zdrowia ludzi.

Przeprowadzone przez Doktorantkę szeroko zakrojone eksperymenty oraz uzyskane wyniki w istotnym stopniu poszerzają wiedzę naukową w temacie grzybów entomopatogennych, a w przyszłości mogą w znaczącym stopniu wpłynąć na opracowanie nowatorskich technologii umożliwiających ich szersze zastosowanie jako bioinsektycydów w agroekologii.

3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej przedstawione w publikacjach naukowych i ich znaczenie

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr A. Litwin zaliczam:

- I. Przygotowanie pracy przeglądowej, która wprowadza do tematu związanego realizacją projektu doktorskiego (**P1**). W pracy tej przedstawiono zdolności grzybów entomopatogennych do usuwania toksycznych zanieczyszczeń oraz syntezy wtórnych metabolitów.
- II. Potwierdzenie niekorzystnego wpływu pyretroidów na tworzenie blastospor *B. bassiana* w hodowlach płynnych, przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu pyretroidów na aktywność metaboliczną grzyba. Obserwacje te zostały opisane po raz pierwszy w literaturze naukowej (**P2** - Litwin i in. 2021).
- III. Wykazanie, że pyretroidy (λ -cyhalotryna, α -cypermetryna oraz deltametryna) akumulują się w grzybni *B. bassiana* (**P2** - Litwin i in. 2021 oraz **P3** – Litwin i in. 2023). Uzyskane wyniki mają charakter nowatorski, ponieważ dostępne dotąd dane literaturowe wskazywały na zdolność do akumulacji pyretroidów jedynie w tkankach roślinnych i zwierzęcych.
- IV. Potwierdzenie wpływu pyretroidów na profil fosfolipidowy oraz zawartość neutralnych lipidów w komórkach *B. bassiana* (**P2** i **P3**).
- V. Wykazanie, że pyretroidy wywołują u grzyba entomopatogennego *B. bassiana*: stres oksydacyjny, wzrost zawartości wolnych rodników, nadprodukcję flawohemoproteiny oraz S-transferazy glutationowej, zmiany w produkcji katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (**P3**).

Zamieszczone w pracy doktorskiej wprowadzenie zostało napisane w sposób interesujący i wskazujący na najważniejsze problemy, które skłoniły Doktorantkę do podjęcia się badań w tym temacie. Podsumowanie najważniejszych wyników odnosi się do publikacji (P2 i P3). Liczba, znaczenie i aktualność wykorzystanych w pracy doktorskiej referencji (ok. 80 pozycji) oraz sposób pisania potwierdzają praktyczną i teoretyczną wiedzę Doktorantki na temat przedstawianego w rozprawie problemu. Większość zacytowanych przez Doktorantkę prac została opublikowana w ostatnich dziesięciu latach w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych.

4. Ogólny dorobek naukowy Doktorantki

Całkowity dorobek publikacyjny Doktorantki na dzień złożenia pracy doktorskiej to cztery prace naukowe (w 3 z nich jako pierwszy autor). Sumaryczny dorobek

naukometryczny tych prac został wyliczony na: $IF_{2021} = 35.353$ oraz $MEiN = 520$. Łączna liczba cytowań wynosi 67 i należy się spodziewać, że w najbliższym czasie będzie wzrastać. Dużą uwagę należy zwrócić na liczbę doniesień konferencyjnych Doktorantki (48 łącznie, w tym 35 w języku angielskim), co świadczy o dużej aktywności w promowaniu swoich badań naukowych na arenie międzynarodowej. Warto podkreślić również dużą aktywność Doktorantki w działalności organizacyjnej (wskazano aż 10 aktywności), np. udział w organizacji 4 konferencji naukowych, warsztatów, promocja studiów doktoranckich.

5. Podsumowanie

Podsumowując, praca doktorska mgr A. Litwin stanowi zbiór oryginalnych prac przedstawiających niezwykle ważny i aktualny problem naukowy związany z określeniem mechanizmów oporności grzyba entomopatogennego *B. bassiana* na insektycydy z grupy pyretroidów. Zaplanowane w trakcie realizacji projektu doktorskiego doświadczenia przeprowadzono przy użyciu zróżnicowanych technik, które pozwoliły na uzyskanie niezwykle cennych wyników badań, które zostały bardzo dokładnie przeanalizowane i omówione w publikacjach naukowych stanowiących część pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska została poprawnie przygotowana pod względem redakcyjnym.

6. Uwagi i pytania

Uwagi:

(i) W publikacji P2 (Litwin i in. 2021) nie określono jaką ilość suchej masy grzybnicy wprowadzono do 24-dółkowych płytek podczas badania wpływu perytroidów na aktywność *B. bassiana* (z wykorzystaniem metody FDA).

Do dyskusji:

(ii) W literaturze naukowej istnieje wiele doniesień na temat promowania wzrostu roślin przez szczepki grzyba *B. bassiana*. Doktorantka wspomina o tych właściwościach grzyba *B. bassiana* w pracy przeglądowej. Czy wiadomo, które z aktywności promujących wzrost roślin przez ten grzyb zostały potwierdzone oraz czy badano jednoczesny wpływ i efekt stosowania tego grzyba na insekty (bioinsektycyd) i promowanie wzrostu roślin w uprawach?

1. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Anny Katarzyny Litwin przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną **bardzo dobrą** ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnioskuje do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr A. Litwin do dalszych etapów

postępowania o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, zwracam się do Członków Komisji o **wyróżnienie pracy doktorskiej** za wysoki poziom merytoryczny i szczególne walory poznawcze, które dostarczyły nowych i cennych danych w zakresie badań nad grzybem *B. bassiana*, a w efekcie w sposób istotny poszerzyły możliwości zastosowania mikroorganizmów w potencjalnym wykorzystaniu tego szczepu w zwalczaniu insektów i stosowaniu go w biopreparatach stosowanych w tym celu w rolnictwie.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

Handwritten signature of Katarzyna Hrynkiewicz in blue ink.