

Prof. dr hab. inż. Ewa Liwarska-Bizukojć
Politechnika Łódzka
Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska
Instytut Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych

Łódź, 31.01.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Nowak
pt. „Potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec insektycydów
chemicznych i mykotoksyn fuzaryjnych - wieloaspektowa charakterystyka”
Promotor: dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne z dnia 22.12.2022 r. z prośbą o przygotowanie oceny wspomnianej wyżej pracy doktorskiej zgodnie z uchwałą tejże Komisji Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 13.12.2022 r.

Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Mgr Monika Nowak przedstawiła pracę doktorską zatytułowaną „Potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec insektycydów chemicznych i mykotoksyn fuzaryjnych - wieloaspektowa charakterystyka” w formie cyklu trzech artykułów naukowych, z których jeden, cytowany poniżej, został opublikowany w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym, posiadających *Impact Factor* 5.305 (100 pkt. MEiN).

Praca 1 oznaczona jako P-1: Nowak Monika, Bernat Przemysław, Mrozińska Julia, Różalska Sylwia (2020). Acetamidrid Affects Destruxins Production but Its Accumulation in *Metarhizium* sp. Spores Increases Infection Ability of Fungi. *Toxins* (Basel). 12, 587. <https://doi.org/10.3390/toxins12090587> (IF_{5-letni}: 5.305, MEiN:100 pkt.)

Natomiast pozostałe dwa są wysłane i recenzowane w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim IF, to jest w *International Biodeterioration and Biodegradation* oraz w *Environmental Microbiology*. Są to dwie następujące prace.

Praca 2 oznaczona jako P-2: Nowak Monika, Soboń Adrian, Bernat Przemysław, Różalska Sylwia (2022). Entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps* biotransform zearalenone - metabolomic and proteomic backgrounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*.

(IF_{5-letni}: 5,354, MEiN: 140 pkt.)

Praca 3 oznaczona jako P-3: Nowak Monika, Bernat Przemysław, Różalska Sylwia (2022). *Metarhizium anisopliae* under the action of *Fusarium* mycotoxins – elimination study of zearalenone and deoxynivalenol and insights into the production of *Metarhizium* secondary metabolites. *Environmental Microbiology*. (IF_{5-letni}: 6,820, MEiN: 140 pkt.)

Wymienione wyżej prace naukowe, jedna opublikowana i dwie nieopublikowane, zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, cel pracy, metodologię badań, syntetyczne omówienie wyników przedstawionych w cyklu trzech prac naukowych, podsumowanie i stwierdzenia końcowe, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz literatury uzupełniającej. Doktorantka przedstawiła także oświadczenia współautorów opublikowanych i zgłoszonych do publikacji artykułów naukowych zaliczonych do cyklu, źródła finansowania badań oraz swój dorobek naukowy. Rozprawa doktorska jest w mojej ocenie kompletna, a jej układ oceniam jako prawidłowy.

Udział procentowy mgr Moniki Nowak w przygotowaniu poszczególnych prac naukowych, stanowiących cykl przedłożony do recenzji jako rozprawa doktorska, był według mnie wysoki i wynosił 70% w artykule naukowym opublikowanym w *Toxins* oraz 75% i 80% w artykułach zgłoszonych do publikacji odpowiednio w *International Biodeterioration and Biodegradation* oraz w *Environmental Microbiology*. Doktorantka nie była autorem korespondującym w żadnej z tych trzech prac naukowych.

Przed ukończeniem przygotowywanej przeze mnie recenzji praca P-2 została zaakceptowana do druku w czasopiśmie *International Biodeterioration and Biodegradation*.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Najpierw chciałabym odnieść się do celowości podjętego przez Doktorantkę tematu pracy doktorskiej. Grzyby entomopatogenne odgrywają ważną rolę w ekosystemach, gdyż biorą udział w regulacji liczebności owadów. Mają też znaczenie praktyczne w rolnictwie, bo wchodzi w skład biopreparatów stosowanych w celu eliminacji szkodników upraw. Jest to niezwykle ważne i perspektywiczne zastosowanie tych grzybów, ponieważ wiele stosowanych obecnie insektycydów, pomimo mniejszej toksyczności niż stosowane wcześniej związki chloroorganiczne, stanowi zagrożenie dla organizmów żywych, w tym przede

wszystkim dla pszczoł, i jest wycofywane z użycia w krajach UE. Niektóre z nich, jak wybrany przez Doktorantkę acetamipryd, mogą być jeszcze stosowane, dlatego warto poddać badaniom możliwości usuwania go ze środowiska przyrodniczego, na przykład z pomocą grzybów entomopatogennych. Warto również dokładniej sprawdzić możliwości zastąpienia insektycydów przez grzyby entomopatogenne. Ze względu na mało poznane dotychczas przemiany biochemiczne mykotoksyn fuzaryjnych, jak zearalenon (ZEN), w hodowlach grzybów entomopatogennych, interesujące i nowatorskie jest podjęcie przez Doktorantkę prac badawczych w tym zakresie. Reasumując uważam, że podjęcie badań na temat oceny potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych wobec zanieczyszczeń środowiska glebowego, zarówno tych antropogenicznych, jak i tych pochodzenia naturalnego, jest uzasadnione merytorycznie.

Mgr Monika Nowak postawiła sobie trzy cele badawcze, a mianowicie (1) ocenę potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych z rodzaju *Metarhizium* wobec acetamiprydu oraz określenie możliwości skojarzonego działania jednego z badanych gatunków grzyba oraz insektycydu chemicznego przeciwko szkodnikowi produktów rolnych, (2) ocenę potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych z rodzaju *Cordyceps* w stosunku do zearalenonu, połączoną z analizą proteomiczną enzymów zaangażowanych w ten proces, (3) ocenę potencjału eliminacyjnego grzyba entomopatogennego *Metarhizium anisopliae* ARSEF7487 wobec zearalenonu oraz dezoksyniwalenolu, w trakcie ekspozycji zarówno na pojedyncze substancje, mieszaninę związków, jak i mykotoksyny pochodzące z surowych ekstraktów pochodzących *Fusarium* spp. Sformułowane przez Doktorantkę cele są zgodne z tematem pracy doktorskiej i posiadają cechy nowości naukowej.

Metodyka badań przyjęta przez Doktorantkę nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Korzystała Ona w swojej pracy z wielu zaawansowanych, nowoczesnych technik badawczych, takich jak chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS), elektroforeza 1-D oraz 2-D, spektrometria mas MALDI-TOF/TOF. Ponadto do opracowania wyników używała metod statystycznych zaimplementowanych w specjalistycznych programach, jak Statistica 13.1 (StatSoft) oraz MarkerView (Sciex). Świadczy to o dobrym przygotowaniu do pracy naukowej i odpowiednim warsztacie analityczno-naukowym Doktorantki.

Pani mgr Monika Nowak rozpoczęła swoje badania od skringingu grzybów entomopatogennych i wytypowania 6 szczepów grzybów z rodzaju *Metarhizium*, które stanowiły organizmy modelowe w pierwszym etapie badań (praca P-1). Wytypowane gatunki grzybów charakteryzowały się tolerancją na obecność acetamiprydu w podłożu hodowlanym

i, co wykazano w dalszej kolejności, zdolnościami do usuwania tego insektycydu. Biorąc pod uwagę ogólnie stosowane w ochronie i inżynierii środowiska miary poziomu usunięcia zanieczyszczeń, to stopień usunięcia acetamiprydu przez grzyby z rodzaju *Metarhizium* nie był wysoki, gdyż na ogół nie przekraczał 30%, a w niektórych układach nie osiągał nawet 20%. Nie mniej warto zauważyć, że Doktorantka dowiodła, że grzyby entomopatogenne akumulują badany przez nią insektycyd neonikotynoidowy, a jego stężenie w grzybni rośnie wraz ze wzrostem stężenia w hodowli. Było to pierwsze opublikowane doniesienie na ten temat w literaturze naukowej. Podobnie rzecz się ma w przypadku opisanego wpływu acetamiprydu na profile 19 typów destruksyn, metabolitów wtórnych grzybów entomopatogennych, u pięciu szczepów z rodzaju *Metarhizium*, dzięki zastosowaniu technik chromatograficznych LC-MS/MS. Ponadto, wykorzystując sprawnie analizę głównych składowych (PCA), Doktorantka wykazała podobieństwa w profilu wytwarzanych destruksyn dla poszczególnych grzybów. Dowiodła też, że grzyby z rodzaju *Metarhizium* mogą charakteryzować się profilami destruksyn swoistymi dla poszczególnych gatunków (praca P-1). W mojej ocenie istotnym osiągnięciem pierwszego etapu pracy są badania toksyczności z udziałem mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*) jako organizmu wskaźnikowego, które zaowocowały zgłoszeniem patentowym pt. „Sposób łączenia grzyba entomopatogennego z insektycydem chemicznym”. Wskazują one, że dzięki skojarzonemu działaniu zarodników *M. brunneum* z acetamiprydem można osiągnąć podobny efekt owadobójczy jak stosując sam insektycyd chemiczny, a ilość związku toksycznego wprowadzanego do środowiska mogłaby znacząco (około 180 razy) zmniejszyć się.

W dalszych badaniach mgr Monika Nowak zaprzestała prac nad usuwaniem insektycydów chemicznych ze środowiska przyrodniczego, co może budzić pewien niedosyt, a skoncentrowała się na usuwaniu mykotoksyn syntezowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* przez grzyby entomopatogenne należące do rodzaju *Cordyceps*. W tej części pracy Kandydatka poświęciła dużo uwagi na identyfikację produktów przemian biochemicznych zearalenonu (ZEN) w hodowlach *Cordyceps* spp. (praca P-2). Dzięki umiejętnemu zastosowaniu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) Doktorantce udało się zidentyfikować 19 pochodnych ZEN, w tym utleniony siarczan ZEN, który został zidentyfikowany po raz pierwszy w szlaku biotransformacji mykotoksyny dla królestwa grzybów (praca P-2). Uważam to za istotny wkład pani mgr Moniki Nowak w rozwój nauk biologicznych, a szczególnie mykologii. Doktorantka zaproponowała też szlak biotransformacji ZEN w hodowli *C. fumosorosea* oraz wskazała różnice w biotransformacji ZEN pomiędzy badanymi szczepami grzybów z rodzaju *Cordyceps* (praca P-2).

Zaproponowany szlak przemian biochemicznych ZEN jest w mojej ocenie poprawny i zgodny z dotychczasową wiedzą z zakresu biochemii. Doktorantka wykonała również z powodzeniem analizę proteomiczną białek wewnątrzkomórkowych z użyciem elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF w celu identyfikacji enzymów katalizujących przemiany biochemiczne ZEN (praca P-2). Wszystko to świadczy o wysokim poziomie wiedzy ogólnej Doktorantki w dyscyplinie nauk biologicznych.

W ostatnim zaprezentowanym w pracy doktorskiej etapie badań mgr Monika Nowak badała usuwanie mykotoksyn fuzaryjnych oraz wpływ ZEN, DON, ich mieszaniny oraz mykotoksyn wyekstrahowanych bezpośrednio z hodowli dwóch szczepów *Fusarium* na wzrost grzyba entomopatogenicznego *Metarhizium anisopliae* ARSEF748 (praca P-3), wytypowanego na podstawie wcześniejszych testów skринingowych. Niektóre wyniki uzyskane w tej części badań są w mojej ocenie przedstawione niejednoznacznie. Z jednej strony ZEN i DON dodane do hodowli grzyba z rodzaju *Metarhizium* w postaci pojedynczych substancji w stężeniu 1 mg/ml (to jest 1 g/l), a także ich mieszanina, nie miały wpływu na wzrost badanego grzyba entomopatogenicznego. Z drugiej strony okazało się, że ekstrakt z hodowli *F. graminearum* na PDB przy stężeniu ZEN wynoszącym 0,1 mg/l hamował wzrost grzyba z rodzaju *Metarhizium* o $8.02 \pm 2.27\%$, natomiast przy największym badanym stężeniu o $59.04 \pm 3.67\%$ (praca P-3). Utrudnieniem w analizie i interpretacji uzyskanych wyników badań jest stosowanie w jednej pracy różnych jednostek stężenia mykotoksyn fuzaryjnych, to jest mg/l oraz mg/ml. Równocześnie chciałabym podkreślić, że Doktorantka jednoznacznie dowiodła, że wytypowany grzyb entomopatogeny charakteryzuje się wysoką, ponad 80%, skutecznością w usuwaniu ZEN. W pracy P-3, podobnie jak wcześniej w pracy P-2, Kandydatka identyfikowała produkty metabolizmu ZEN podczas usuwania go w hodowli grzybów entomopatogenicznych. W obydwu tych pracach (P2 i P-3) wykazała, że po inhibicji cytochromu P450 entomopatogen nie był zdolny do hydroksylacji ZEN, przez co określiła mechanizm biochemiczny biotransformacji ZEN. Analizując wpływ mykotoksyn fuzaryjnych na produkcję metabolitów wtórnych przez entomopatogeny, Doktorantka dowiodła, że najbardziej istotne zaburzenie metabolizmu wtórnego występuje podczas traktowania *M. anisopliae* obiema mykotoksynami jednocześnie oraz mieszaniną związków zawartych w ekstrakcie *F. graminearum*.

Podsumowując ocenę merytoryczną pracy doktorskiej mgr Moniki Nowak, uważam, że Doktorantka zrealizowała postawione na początku pracy cele badawcze. Mgr Monika Nowak wykazała, że niektóre grzyby entomopatogenne są zdolne do usuwania acetamiprydu, będącego insektycydem chemicznym, a także do usuwania mykotoksyn fuzaryjnych. Ponadto

wykazała, że dzięki skojarzonemu działaniu zarodników *M. brunneum* z acetamiprydem można obniżyć ilość wprowadzanego do środowiska przyrodniczego acetamiprydu, osiągając przy tym podobny efekt owadobójczy, jak przy stosowaniu samego insektycydu chemicznego. Te obiecujące wyniki badań zaowocowały złożeniem zgłoszenia patentowego i mogą być wykorzystane w przyszłości w produkcji insektycydów. Na podkreślenie zasługuje, że Doktorantka zidentyfikowała metabolity powstające podczas biotransformacji zearalenonu w hodowli grzybów entomopatogennych z rodzaju *Metarhizium* i *Cordyceps* oraz zaproponowała szlaki biotransformacji tej mykotoksyny. Oceniała też wpływ mykotoksyn fuzaryjnych na wzrost grzybów entomopatogennych. To wszystko stanowi Jej oryginalny wkład w rozwiązanie problemu naukowego, który postawiła sobie na początku realizacji pracy doktorskiej, a także poszerza wiedzę na temat grzybów entomopatogennych, w tym ich roli w środowisku glebowym.

Ocena formalna pracy

W mojej ocenie praca jest dobrze przygotowana pod względem formalnym. Język, którego używa Doktorantka, zarówno w opisie będącym wprowadzeniem do cyklu prac, jak i w samych pracach (P-1, P-2, P-3), charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym, jest zrozumiały, a przedstawiony wywód - logiczny. Wyniki badań zostały bardzo dobrze opracowane, w tym także z użyciem odpowiednio dobranych testów statystycznych. Wykresy i tabele zamieszczone w cyklu prac są czytelne i spójne z treścią przedstawianą przez Autorkę w tych pracach (P-1, P-2, P-3). Nie znalazłam istotnych błędów językowych ani błędów edycyjnych, które utrudniałyby zrozumienie pracy czytelnikowi. Uważam jedynie, że odnosząc się ogólnie do środowiska lepiej byłoby używać terminu środowisko przyrodnicze zgodnie z definicją „środowiska” podaną w Ustawie Prawo Ochrony Środowiska z 27.04.2001 z późn. zm. niż terminu środowisko naturalne. W pracy P-3 lepiej byłoby zastosować te same jednostki stężenia dla badanych substancji.

Przygotowując rozprawę doktorską, Doktorantka korzystała z odpowiednio dobranych do tematu pracy źródeł literaturowych. Były to prawie wyłącznie artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopiśmie posiadających wysoki współczynnik wpływu (*IF*). Duża część z nich, bo w zależności od pracy od około 42% do około 47% to pozycje, które ukazały się w latach 2017-2022. Wskazuje to na korzystanie z najnowszych osiągnięć naukowych, a także na aktualność podjętego przez Doktorantkę tematu badań. W każdej z prac wchodzących w skład cyklu, zarówno tych opublikowanych, jak i nieopublikowanych, Doktorantka skorzystała z kilkudziesięciu, a dokładniej było to od 30 do około 52, źródeł

literaturowych. Oprócz tego Kandydatka zamieściła liczący 42 pozycje wykaz literatury uzupełniającej we wprowadzeniu do przedkładanego cyklu prac P-1, P-2 i P-3.

Uwagi dyskusyjne do rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską mgr Moniki Nowak oceniam jednoznacznie pozytywnie. Chciałabym jednak przedstawić cztery uwagi, będące równocześnie pytaniami do Doktorantki.

Dlaczego do oceny potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych Doktorantka wybrała mykotoksyny fuzaryjne? Czy były jakieś inne przesłanki oprócz tej, że grzyby z rodzaju *Fusarium* koegzystują z grzybami entomopatogennymi w środowisku glebowym?

Druga uwaga dotyczy wybranego do badań układu acetamipryd - grzyby entomopatogenne. Dlaczego Doktorantka wybrała grzyby entomopatogenne do usuwania insektycydów chemicznych? Są doniesienia sprzed kilku lat (lata 2013 - 2020), świadczące o tym, że np. grzyby z rodzaju *Fusarium* (<https://doi.org/10.1007/s10532-018-9855-8>), czy bakterie (<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.038>), czy też konsorcja mikroorganizmów (10.3389/fmicb.2020.01429) zdolne są w bardzo wysokim stopniu, niemal w 100%, do usuwania acetamiprydu.

Na każdym z trzech głównych etapów badań Doktorantka prowadziła, według mnie bardzo słusznie, na wstępie testy skryningowe w celu wytypowania najbardziej odpowiednich do danego zadania szczepów grzybów entomopatogennych. Natomiast mniej wiadomo, dlaczego wybierane były takie, a nie inne, zakresy stężeń usuwanych przez entomopatogeny substancji chemicznych. Stąd moje pytanie, na jakiej podstawie Doktorantka określiła zakres stężeń badanych substancji, to jest przede wszystkim acetamiprydu i zearalenonu.

Jak Doktorantka ocenia szanse wykorzystania w praktyce na szerszą skalę skojarzonego działania zarodników grzybów z rodzaju *Metharizium* z acetamiprydem, co było przedmiotem zgłoszenia patentowego.

Prosiłabym, żeby Doktorantka odniosła się na publicznej obronie do tych czterech uwag.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Chciałabym podkreślić, że wymienione powyżej uwagi mają głównie charakter dyskusyjny i nie powodują zmiany w mojej ogólnie bardzo pozytywnej ocenie niniejszej rozprawy doktorskiej. Według mnie całokształt przedstawionej do recenzji rozprawy

doktorskiej, wysoki udział procentowy Doktorantki podany w oświadczeniach współautorów prac opublikowanych i nieopublikowanych, a także dorobek Doktorantki, świadczy o spełnieniu kryteriów stawianych pracom doktorskim.

Podsumowując recenzję, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Nowak spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Moniki Nowak do dalszych przewidzianych przepisami etapów przewodu doktorskiego.



Ewa Liwarska-Bizukojć