



Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań  
Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl  
www.igr.poznan.pl  
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

dr hab. Lidia Błaszczuk, prof. IGR PAN  
Zakład Mikrobiomiki Roślin  
Instytut Genetyki Roślin  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

Poznań, dnia 9 lutego 2023 roku

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr **Moniki Nowak**  
pt: **"Potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec insektycydów chemicznych i mykotoksyn fuzaryjnych – wieloaspektowa charakterystyka"**,  
wykonanej pod kierunkiem Pani **dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ**  
w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii,  
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, Pani prof. dr hab. Agnieszki Marczak z dnia 22 grudnia 2022 roku, w którym to zostałam poinformowana o powierzeniu mi decyzją Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, podjętą na posiedzeniu w dniu 13 grudnia 2022 roku, funkcji recenzenta pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Nowak, zatytułowanej: "Potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec insektycydów chemicznych i mykotoksyn fuzaryjnych – wieloaspektowa charakterystyka".

### OCENA FORMALNA

Na przedłożoną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Moniki Nowak, zatytułowaną: „**Potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec insektycydów chemicznych i mykotoksyn fuzaryjnych – wieloaspektowa charakterystyka**”, składa się **1 opublikowana praca oryginalna**, oraz **2 prace oryginalne przyjęte do recenzji**:

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. [doi.org/10.3390/toxins12090587](https://doi.org/10.3390/toxins12090587). (IF<sub>2021</sub>=5,075; IF<sub>5-letni</sub>=5,305; pkt. MEiN=100)
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* - **w recenzji**.
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 - w recenzji.

W opublikowanej pracy Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej udział w powstanie tej pracy jest znaczący i oszacowany został na 70%. Doktorantka odpowiedzialna była za planowanie i wykonanie większości prac eksperymentalnych, opracowanie i analizę statystyczną wyników, przygotowanie manuskryptu oraz graficzne opracowanie wyników, a także współudział w tworzeniu koncepcji pracy, opracowaniu odpowiedzi dla recenzentów i ostatecznej wersji manuskryptu. W powstanie drugiej pracy, zatytułowanej „Entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps* biotransform zearalenone - metabolomic and proteomic backgrounds” i będącej w recenzji w czasopiśmie International Biodeterioration and Biodegradation, udział Pani mgr Moniki Nowak również jest znaczący i został oszacowany na 75%. W pracy tej, oprócz współudziału w tworzeniu koncepcji pracy i optymalizacji metody LC-MS/MS, Doktorantka odpowiedzialna była za planowanie i wykonanie prac eksperymentalnych, opracowanie i analizę statystyczną wyników, przygotowanie manuskryptu oraz graficzne opracowanie wyników. Największy udział, bo szacowany aż na 80% Pani mgr Monika Nowak miała w powstanie trzeciej pracy, przyjętej do recenzji w Environmental Microbiology, który obejmował te same zadania co powyżej. Na podstawie przygotowanych oświadczeń można zatem uznać, iż udział Pani mgr Moniki Nowak w powstanie 1 opublikowanej pracy oryginalnej i 2 przyjętych do recenzji prac oryginalnych, stanowiących podstawę pracy doktorskiej, jest wiodący.

Oprócz ocenianych trzech prac oryginalnych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Pani mgr Monika Nowak przedstawiła dodatkową dokumentację - autoreferat zawierający następujące dane:

- źródło finansowania badań
- spis publikacji wchodzących w skład rozprawy
- omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników
- wnioski i stwierdzenia końcowe
- streszczenie w języku polskim
- streszczenie w języku angielskim
- dorobek naukowy
- literatura uzupełniająca
- załączniki (kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej)
- oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach.

Całość przedstawionej dokumentacji obejmuje 167 stron. W części dotyczącej omówienia celu naukowego i uzyskanych wyników Doktorantka wprowadza w tematykę badawczą i naświetla problem, który planuje rozwiązać, stawia cel pracy, opisuje metodologię badań, zastosowane techniki badawcze oraz oprogramowania komputerowe służące do procesowania i analizy uzyskanych danych i omawia wyniki badań obejmujących cykl prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W części dotyczącej dorobku naukowego, Pani Monika Nowak podsumowuje swój dorobek naukowy, przedstawia spis publikacji, których jest współautorem, a które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej, informuje o zgłoszeniu patentowym, doniesieniach konferencyjnych, projektach badawczych, odbytych kursach, szkoleniach, konferencjach naukowych i działalności popularyzującej naukę.

Pragnę podkreślić, iż przedstawiona dokumentacja, wraz z jej zasadniczą częścią stanowiącą podstawę rozprawy doktorskiej została napisana poprawnie pod względem stylistycznym, leksykalnym i gramatycznym. Ponadto stanowi bardzo uporządkowane, czytelne, zwarte, ale treściwe opracowanie, właściwe pracom naukowym.

**Na podstawie przedstawionej dokumentacji stwierdzam, iż przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl Ustawy 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.).

## OCENA MERYTORYCZNA

Zasadniczą częścią przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, zatytułowanej: „**Potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec insektycydów chemicznych i mykotoksyn fuzaryjnych – wieloaspektowa charakterystyka**” jest cykl trzech prac - jednej opublikowanej pracy oryginalnej [Nowak Monika, Bernat Przemysław, Mrozińska Julia, Różalska Sylwia (2020). Acetamiprid Affects Destruxins Production but Its Accumulation in *Metarhizium* sp. Spores Increases Infection Ability of Fungi. *Toxins* (Basel), 12, 587. doi.org/10.3390/toxins12090587], oraz dwóch prac oryginalnych przyjętych do recenzji [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* - w recenzji; 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* - w recenzji].

Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyka niezwykle istotnego problemu jakim jest dostarczenie proekologicznych i wielofunkcyjnych narzędzi, opartych na naturalnych właściwościach mikroorganizmów, tutaj grzybów entomopatogennych, które wspierałyby ograniczanie występowania szkodników roślin uprawnych i produktów rolnych, a zarazem umożliwiały eliminację ze środowiska rolniczego szkodliwych substancji, w tym insektycydów. O istocie tej problematyki, jak i o konieczności podjęcia badań zmierzających do określenia potencjału eliminacyjnego wybranych gatunków grzybów entomopatogennych wobec zanieczyszczeń środowiska glebowego i poznania mechanizmów determinujących przystosowanie się tych mikroorganizmów do niekorzystnych warunków, Doktorantka pisze w 3-stronnicowym rozdziale „Wprowadzenie” przedłożonego opracowania i we wstępie każdej z załączonych prac. Cytuje przy tym prace odpowiadające przedstawianej problematyce badawczej, w tym te najbardziej aktualne. Następnie Doktorantka definiuje trzy cele badawcze: a) ocena 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; b) ocena potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych z rodzaju *Cordyceps* w stosunku do zearalenonu, połączona z analizą proteomiczną enzymów zaangażowanych w ten proces; c) ocena potencjału eliminacyjnego grzyba entomopatogennego *Metarhizium anisopliae* ARSEF7487 wobec zearalenonu oraz deoksyniwalenolu, w trakcie ekspozycji zarówno na pojedyncze substancje, mieszaninę związków, jak i mykotoksyny pochodzące z surowych ekstraktów pochodzących z *Fusarium* spp. **Pojawia się w tym miejscu pytanie, czy sformułowane cele zbudowano wyłącznie na podstawie danych literaturowych, czy też wyników wstępnych? Jeśli również na podstawie wstępnych obserwacji, to sugerowałabym, a nawet uznała za konieczne postawienie hipotezy badawczej. Proszę o komentarz.**

Sposób, w jaki zostały zrealizowane powyższe cele badawcze, w tym metodykę badań, Pani mgr Monika Nowak przedstawiła w trzech pracach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Ponadto w załączonym opracowaniu – autoreferacie, Doktorantka przedstawiła opis zastosowanych technik, metod oraz oprogramowania, które posłużyło jej do analizy danych, a także zamieściła streszczenie uzyskanych wyników badań w 10-stronnicowym rozdziale zatytułowanym: „Syntetyczne omówienie wyników badań przedstawionych w cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej”. Pragnę podkreślić, iż Doktorantka do rozwiązania wyznaczonych celów badawczych zastosowała kilka kluczowych technik, od podstawowej spektrofotometrii, spektrofluorymetrii, czy elektroforezy 1-D i 2-D, po chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas LC-MS/MS i spektrometrią mas MALDI-TOF/TOF. Do procesowania i analizy uzyskanych danych wykorzystwała takie narzędzia informatyczne jak: ChemSketch (ACD/Labs), MarkerView (Sciex), LightSight

(Sciex), PeakView (Sciex), Image Master 2D Platinum (GE Healthcare Life Sciences), ProteinPilot (Sciex), Statistica 13.1 (StatSoft). Stwierdzam, iż dobór metod i oprogramowania był odpowiedni do osiągnięcia wyznaczonych przez Doktorantkę celów badawczych.

W opublikowanej pracy pt.: „Acetamidrid Affects Destruksyns Production but Its Accumulation in *Metarhizium* sp. Spores Increases Infection Ability of Fungi” [Nowak M., Bernat P., Mrozińska J., Różalska S. (2020). Toxins (Basel)], Pani mgr Monika Nowak wykorzystwała 6 wyselekcjonowanych na podstawie wcześniejszych badań szczepów grzybów z rodzaju *Metarhizium*, tj. *M. anisopliae* ARSEF7487, *M. brunneum* ARSEF2107, *M. globosum* ARSEF2596, *M. robertsii* ARSEF727, *M. robertsii* IM6519 oraz *M. robertsii* IM2358. Wykazała, iż szczepy te charakteryzują się wysoką tolerancją wobec acetamiprydu, jednak przy wyższych jego stężeniach w hodowli (25 - 50 mg/L) akumulują ten neonikotynoidowego insektycyd w grzybni. Odnotowała również negatywny wpływ acetamiprydu na syntezę destruksyn przez badane szczepy grzybów. Ostatecznie oceniła potencjał infekcyjny zarodników *M. brunneum* wobec larw mącznika młynarka (łac. *Tenebrio molitor*). Przeprowadzone doświadczenie udokumentowało silne, owadobójcze działanie zarodników ze zakumulowanym acetamiprydem, porównywalne, a nawet bardziej efektywne niż po zastosowaniu środka owadobójczego. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż wynik ten stał się podstawą do zgłoszenia patentowego w Urzędzie Patentowym RP, pt. „Sposób łączenia grzyba entomopatogennego z insektycydem chemicznym”, o numerze P.434091.

### **Pytania, uwagi i komentarze:**

1. Doktorantka sugeruje, iż istotny wpływ acetamiprydu na syntezę destruksyn przez szczep *M. brunneum* może mieć związek z obserwowanym najniższym poziomem akumulacji tego insektycydu w grzybni *M. brunneum*. Jaki mechanizm/-y mógłby/mogłyby warunkować to zjawisko?
2. Zdaniem Doktorantki analiza profili destruksyn dowiodła, że grzyby z rodzaju *Metarhizium* mogą charakteryzować się profilami destruksyn swoistymi dla poszczególnych gatunków. Jakie badania należałoby przeprowadzić, by udowodnić to stanowisko?
3. Czy wszystkie analizy wykonano w wyniku hodowli grzybów na komercyjnym podłożu płynnym Czapek-Dox? Jeśli tak, to jak ocenia się stopień zarodnikowania szczepów z rodzaju *Metarhizium* na tym podłożu w stosunku do ilości grzybni? Czy inne podłoże mogłoby mieć wpływ na produkcję destruksyn przez badane szczepy i ich reakcję na zastosowany insektycyd?
4. Brak informacji o pochodzeniu owadów stosowanych w pracy do oceny infekcyjności zarodników *M. brunneum*.
5. W publikacji brak jest rozdziału „Discussion” lub „Results and discussion”, natomiast elementy charakterystyczne dla dyskusji znajdują się w rozdziale 2 „Results” – proszę o komentarz.

W drugiej pracy, zatytułowanej „Entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps* biotransform zearalenone – metabolomic and proteomic backgrounds”, będącej w recenzji w czasopiśmie International Biodeterioration and Biodegradation, Pani mgr Monika Nowak wykorzystwała trzy gatunki/szczepy grzybów: *Cordyceps fumosorosea* ARSEF2679, *Cordyceps farinosa* ARSEF1939 i *Cordyceps tenuipes* ARSEF2488. Wstępnie wykazała zdolność tych szczepów do eliminacji z podłoża hodowlanego zearalenonu – mykotoksyny produkowanej przez gatunki z rodzaju *Fusarium*. Dalsze analizy wykazały, że zearalenon może być eliminowany przez badane szczepy na drodze reakcji I i II fazy, z których I faza obejmuje utlenianie, redukcję oraz hydrolizę, a II faza związana jest z biotransformacją, podczas której toksyna łączy się z aktywowanym kwasem glukuronowym czy siarczanem. Doktorantka łącznie zidentyfikowała 19 pochodnych zearalenonu, przy czym odnotowała występowanie różnic pomiędzy gatunkami *Cordyceps* w metabolizacji tej toksyny. W przypadku *C. fumosorosea* zaproponowany szlak biotransformacji mykotoksyny składał się z 18 metabolitów, a dwie z tych pochodnych - utleniony siarczan zearalenonu oraz utleniony siarczan zearalenolu po raz pierwszy opisano dla grzybów. W niniejszej pracy Doktorantka pośrednio, poprzez użycie inhibitora 1-aminobenzotriazolu w hodowlach *C. fumosorosea*, wykazała, iż w procesie utleniania

zearalenonu może uczestniczyć cytochrom P450. W oparciu o analizy proteomiczne udokumentowała możliwy udział enzymów odpowiedzialnych za sulfonowanie mykotoksyny (adenylotransferazy siarczanowej oraz kinazy adenylosiarczanowej); białek z rodziny krótkołańcuchowych dehydrogenaz/reduktaz ( $3\alpha$ - i  $3\beta$ -dehydrogenaz hydroksysteroidowych); enzymów, które mogą być odpowiedzialne za proces glikozylacji zearalenonu i jego pochodnych hydroksylowanych (UDP-glukozylotransferaz). Dodatkowo Pani Monika Nowak oceniła wpływ zearalenonu na produkcję bowerycyny przez szczep *C. fumosorosea* podczas hodowli na podłożu płynnym Czapek Dox.

**Pytania, uwagi i komentarze:**

1. Czy zbadano wpływ metanolu użytego do przygotowania odpowiednich stężeń zearalenonu na grzyby z rodzaju *Cordyceps*?
2. W celu oszacowania zdolności grzybów z rodzaju *Cordyceps* do eliminacji i metabolizacji zearalenonu stosowano hodowlę ciągłą, a próby pobierano w kilku punktach czasowych. Nie podano natomiast jaką objętość z hodowli pobierano do dalszych analiz. Czy zmiany w objętości hodowli po każdorazowym poborze prób mogły wpłynąć na biomasa grzyba i procesy biotransformacji toksyny? – proszę o komentarz.
3. W związku z obserwowanym spadkiem żywotności grzybów w 12 godzinie hodowli z dodatkiem toksyny warto byłoby rozważyć analizę wpływu tej toksyny na biomasa badanych szczepów.
4. Czy sprawdzano zdolność *Cordyceps farinosa* ARSEF1939 i *Cordyceps tenuipes* ARSEF2488 do produkcji bowerycyny na innym niż Czapek Dox podłożu hodowlanym?

W trzeciej pracy wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, zatytułowanej: „*Metarhizium anisopliae* under the action of *Fusarium* mycotoxins – elimination study of zearalenone and deoxynivalenol and insights into the production of *Metarhizium* secondary metabolites”, Pani mgr Monika Nowak wykorzystwała szczep *Metarhizium anisopliae* ARSEF748 oraz dwa szczepy *Fusarium*: *F. culmorum* DSM1094 i *F. graminearum* DSM4527 zdolne do produkcji zearalenonu i deoksyniwalenolu. Wykazała, że zarówno zearalenon, jak i deoksyniwalenol, a także mieszanina tych dwóch mykotoksyn dodane do hodowli płynnej w stężeniach 0.1, 0.25, 0.5 i 1 mg/mL nie mają wpływu na wzrost *M. anisopliae*. Co ciekawe, ekstrakt z hodowli *F. graminearum* na płynnym podłożu ziemniaczanym (ang. *Potato Dextrose Broth*, PDB) wpłynął na zahamowanie wzrostu *M. anisopliae*, a ekstrakt z *F. graminearum* na stałym podłożu ryżowym (ang. *Rice Medium*, RM) spowodował przyrost biomasy *M. anisopliae*. Doktorantka wykazała ponadto, że *M. anisopliae* charakteryzuje się podobnym potencjałem eliminacyjnym wobec mykotoksyn fuzaryjnych bez względu na formę zaaplikowanego do hodowli związku. Udokumentowała, że szczep *M. anisopliae* eliminuje zearalenon poprzez biotransformację do pochodnych hydroksylowanych, utlenionych oraz z przyłączonym kwasem glukuronowym i pośrednio wykazała, że cytochrom P450 może być zaangażowany w biotransformację tej toksyny. Doktorantka ponadto udowodniła, że ekstrakt pochodzący z *F. graminearum* wpływa hamująco na produkcję destruksyn i swansoniny przez *M. anisopliae*, a dodatek deoksyniwalenolu oraz mieszaniny zearalenonu i deoksyniwalenolu hamuje produkcję samej swansoniny przez ten entomopatogeny grzyb.

**Pytania, uwagi i komentarze:**

1. Proszę o uzasadnienie wyboru szczepu *M. anisopliae* ARSEF748 do niniejszych badań. Czy gatunek *M. brunneum* nie wykazywał zdolności do eliminacji deoksyniwalenolu?
2. Czy szczepy *Fusarium* stosowane w pracy analizowano wcześniej pod względem ich zdolności do produkcji zearalenonu i deoksyniwalenolu? Czy określano jakie reprezentują chemotypy?
3. Czy biomasa grzybów oznaczano w próbach pochodzących z odrębnego doświadczenia niż to, w którym badano wpływ *M. anisopliae* na eliminację i biotransformację mykotoksyn lub analizowano produkcję destruksyn i swansoniny przez grzyb entomopatogeny w obecności mykotoksyn fuzaryjnych? Czym sugerowano się przy wyborze długości prowadzenia hodowli

– tutaj był to 1 dzień? Czy ten czas hodowli nie wydaje się zbyt krótki w przypadku grzybów charakteryzujących się wolniejszym tempem wzrostu? Sugeruję wykonanie takich analiz w dłuższym czasie hodowli, a rekomendowaną metodą jest ilościowy PCR (qPCR).

4. W pracy odnotowano, że ekstrakt z hodowli *F. graminearum* na płynnym podłożu ziemniaczanym (ang. *Potato Dextrose Broth*, PDB) wpłynął na zahamowanie wzrostu *M. anisopliae*, a ekstrakt z *F. graminearum* na stałym podłożu ryżowym (ang. *Rice Medium*, RM) spowodował przyrost biomasy *M. anisopliae*; czym mogą być uwarunkowane obserwowane różnice w reakcji grzyba entomopatogennego?

5. Czy analizy związane z badaniem wpływu toksyn na biomasę grzyba entomopatogennego i produkcję przez niego metabolitów, a także obejmujące ocenę potencjału *M. anisopliae* do eliminacji i biotransformacji mykotoksyn przeprowadzono na podstawie odrębnych doświadczeń, i jeśli tak, to czy ten fakt mógł mieć wpływ na interpretację uzyskanych wyników? – proszę o komentarz.

6. Dlaczego w związku z obserwowaną zdolnością *M. anisopliae* do eliminacji deoksyniwalenolu nie podjęto próby określenia przyczyny tego zjawiska i identyfikacji np. pochodnych toksyny?

Pani Monika Nowak na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników sformułowała wnioski i stwierdzenia końcowe, które przedstawiła w rozdziale IV dołączonego opracowania - autoreferatu. Za najważniejsze z nich uważam:

- po raz pierwszy oceniono potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec acetamiprydu oraz mykotoksyn fuzaryjnych;
- wykazano, że *M. anisopliae* ARSEF7487, *M. brunneum* ARSEF2107, *M. globosum* ARSEF2596, *M. robertsii* ARSEF727, *M. robertsii* IM6519 oraz *M. robertsii* IM2358 częściowo eliminują acetamipryd z podłoża wzrostowego poprzez jego akumulację w grzybni, przy czym ksenobiotyk ten nie powoduje zahamowania wzrostu badanych entomopatogenów;
- dowiedziono, że neonikotynoid istotnie hamuje produkcję destruksyn u badanych grzybów;
- po raz pierwszy wykazano, że skorelowane działanie zarodników *M. brunneum* ARSEF2107 i acetamiprydu powoduje podobny, a nawet lepszy efekt owadobójczy wobec larw *Tenebrio molitor* niż 180-krotnie większa dawka samego insektycydu, co przyczyniło się do opracowania zgłoszenia patentowego w Urzędzie Patentowym RP, pt. „Sposób łączenia grzyba entomopatogennego z insektycydem chemicznym”;
- *Cordyceps fumosorosea* ARSEF2679, *C. farinosa* ARSEF1939 i *C. tenuipes* ARSEF2488 efektywnie eliminują ZEN z podłoża wzrostowego;
- oznaczono łącznie aż 19 pochodnych biotransformacji mykotoksyny fuzaryjnej, a utlenione siarczany ZEN i ZEL zostały zidentyfikowane po raz pierwszy dla królestwa grzybów;
- analiza proteomu wewnątrzkomórkowego podczas ekspozycji na ZEN potwierdziła nadprodukcję adenylotransferazy siarczanowej oraz kinazy adenylotransferazy biorących udział w reakcjach sulfonowania, białek z rodziny krótkołańcuchowych dehydrogenaz/reduktaz odpowiedzialnych za redukcję ZEN oraz UDP-glukozylotransferaz, biorących udział w glikozylacji;
- *Metarhizium anisopliae* ARSEF7487 charakteryzuje się wysokim potencjałem eliminacyjnym wobec ZEN oraz DON, podczas ekspozycji zarówno na pojedyncze substancje, mieszaninę związków, jak i mykotoksyny pochodzące z ekstraktu *F. graminearum*.
- zaproponowany szlak biotransformacji ZEN składa się z metabolitów powstających na drodze redukcji, utleniania oraz glukuronidacji;
- najbardziej istotne zaburzenie metabolizmu wtórnego występuje podczas traktowania *M. anisopliae* obiema mykotoksynami jednocześnie oraz mieszaniną związków zawartych w ekstrakcie *F. graminearum*;

- grzyby entomopatogenne mogą być stosowane nie tylko jako bioinsektycydy, ale również jako czynniki mikrobiologiczne eliminujące zanieczyszczenia środowiska glebowego.

Chciałabym natomiast zwrócić uwagę na stwierdzenie, które Doktorantka zamieściła w omawianym rozdziale, a które brzmi: „Analiza jakościowa i ilościowa LC-MS/MS umożliwiła wyznaczenie specyficznych gatunkowo profili destruksyn dla pięciu szczepów z rodzaju *Metarhizium*.” Raczej w pracy Doktorantka określiła specyficzne dla badanych szczepów profile destruksyn. Aby móc mówić o profilach specyficznych gatunkowo należałoby przeanalizować większą liczbę gatunków, a każdy gatunek powinien być reprezentowany przez co najmniej kilka szczepów. Podobnie stwierdzenie: „Najbardziej istotne zaburzenie metabolizmu wtórnego występuje podczas traktowania *M. anisopliae* obiema mykotoksynami jednocześnie oraz mieszaniną związków zawartych w ekstrakcie *F. graminearum*” uważam za zbyt ogólne, ponieważ Doktorantka analizowała tylko destruksyn i swansoniny u *M. anisopliae*, a nie wszystkie metabolity wtórne.

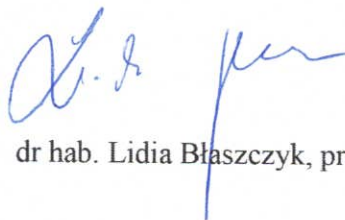
W tym miejscu pragnę podkreślić, że wszystkie zamieszczone uwagi i komentarze do prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Nowak oraz do dołączonego opracowania wskazują wyłącznie na potrzebę dodatkowego wyjaśnienia lub uzupełnienia pewnych zagadnień, ale przede wszystkim rozwinięcia dyskusji nad niektórymi, bardzo interesującymi w moim odczuciu wątkami pracy. Nie umniejszają natomiast wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionej do recenzji dokumentacji stwierdzam, iż tematyka pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Nowak jest niezwykle istotna, dotyka ona bowiem problemu chorób roślin uprawnych wywoływanych przez szkodniki oraz zanieczyszczeń środowiska rolniczego i produktów spożywczych pochodzenia roślinnego toksynami grzybowymi i środkami owadobójczymi. Stwierdzam ponadto, że rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest poznanie potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych wobec zanieczyszczeń występujących w środowisku rolniczym, w glebie oraz zrozumienie mechanizmów determinujących przystosowanie się tych grzybów do niekorzystnych warunków. Uważam, iż rozprawa doktorska prezentuje też doskonałą wiedzę teoretyczną Pani mgr Moniki Nowak w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Stwierdzam zatem, że oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą 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.) i wnioskuję do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr. Moniki Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

W związku z tym, iż zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania i jej efekty są nowatorskie i mogą być istotnym punktem w pracach dotyczących opracowania nowoczesnych, proekologicznych i wielofunkcyjnych metod ochrony roślin oraz narzędzi umożliwiających ograniczenie, a nawet eliminację zanieczyszczeń ze środowiska rolniczego i produktów spożywczych pochodzenia roślinnego, **wnioskuję do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Nowak**. Przedstawiona do recenzji praca wraz z załączonym opracowaniem została przygotowana w sposób klarowny, zwięzły i poprawny pod względem językowym i gramatycznym. Wszystkie uzyskane wyniki zostały szczegółowo udokumentowane i starannie opracowane. Praca prezentuje wyróżniający się poziom merytoryczny i posiada szczególne walory poznawcze. **W niniejszej pracy po raz pierwszy oceniono potencjał eliminacyjny grzybów entomopatogennych wobec substancji owadobójczej - acetamiprydu oraz szkodliwych dla zdrowia ludzi i zwierząt mykotoksyn fuzaryjnych akumulujących się w tkankach roślin uprawnych i w glebie; po raz pierwszy wykazano,**

że skorelowane działanie zarodników *M. brunneum* ARSEF2107 i acetamiprydu powoduje podobny, a nawet lepszy efekt owadobójczy wobec larw *Tenebrio molitor* niż 180-krotnie większa dawka samego insektycydu, co przyczyniło się do opracowania zgłoszenia patentowego w Urzędzie Patentowym RP, pt. „Sposób łączenia grzyba entomopatogenego z insektycydem chemicznym”; w pracy oznaczono pochodne biotransformacji przez grzyby entomopatogenne mykotoksyny fuzaryjnej - zearalenonu, a utlenione siarczany zearalenonu i zearalenolu zidentyfikowano tutaj po raz pierwszy dla grzybów. Biorąc natomiast pod uwagę udział Doktorantki we wszystkich wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pracach, który jest dominujący i wskazuje na umiejętność posługiwania się wysokoprzepustowymi technikami spektrometrii mas, przetwarzania i analizy wygenerowanych tymi technikami danych z wykorzystaniem odpowiednich programów informatycznych, interpretację wyników i przygotowywanie manuskryptów do publikacji, można wnioskować o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Poparciem tego stwierdzenia jest również wyróżniający się dorobek naukowy Pani mgr Moniki Nowak, która jest współautorem 4 publikacji o sumarycznym  $IF=33,299$ , sumarycznej liczbie punktów  $MEiN=520$ , liczbie cytowani=732 i  $H_{indeksie} = 3$ ; współautorem 1 zgłoszenia patentowego i 30 doniesień konferencyjnych krajowych i międzynarodowych. Na szczególne wyróżnienie zasługuje fakt opublikowania przez Doktorantkę części wyników w czasopiśmie Toxins (Basel) o  $IF_{2021}=5,075$ ,  $IF_{5-letnim}=5,305$  i pkt.  $MEiN=100$ , a także zgłoszenia patentowego oznaczonego numerem: P.434091 [WIPO ST 10/C PL434091]. 27.V.2020 i zatytułowanego „Sposób łączenia grzyba entomopatogenego z insektycydem chemicznym, w którym Doktorantka ma 50% udział.



Poznań, dnia 9 lutego 2023 r.

dr hab. Lidia Błaszcyk, prof. IGR PAN