

Streszczenie w języku polskim

Grzyby entomopatogenne to mikroorganizmy biorące udział w biokontroli populacji owadów w środowisku naturalnym. Oprócz powszechnego występowania w glebach, są również wprowadzane do ekosystemów w postaci bioinsektycydów w rolnictwie ograniczającym użycie insektycydów chemicznych, odpowiedzialnych za niepożądane efekty wobec organizmów niecelowanych. Grzyby entomopatogenne w swoim środowisku bytowania mają styczność z licznymi substancjami toksycznymi pochodzenia antropogenicznego oraz produktami metabolizmu koegzystujących z nimi organizmów.

Prezentowana rozprawa doktorska miała na celu ocenę potencjału eliminacyjnego grzybów entomopatogennych wobec stosowanego w wielu preparatach owadobójczych insektycydu neonikotynoidowego – acetamiprydu, a także wobec stwarzających ryzyko toksykologiczne mykotoksyn, produkowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, które koegzystują z entomopatogenami w środowisku glebowym.

W pracy badawczej po raz pierwszy wykazano, że *Metarhizium* spp. charakteryzują się wysoką tolerancją na acetamipryd. Eliminacja związku z podłoża wzrostowego przebiega poprzez akumulację insektycydu w grzybni. Dowiedziono, że *Metarhizium* spp. w obecności neonikotynoidu wydzielają mniej destruksyn do podłoża wzrostowego, co nie było powiązane z zatrzymywaniem ich w grzybni ze względu na zmiany strukturalne błon komórkowych. Ponadto po raz pierwszy wykazano, że profile destruksyn mogą okazać się swoistą cechą dla poszczególnych gatunków z rodzaju *Metarhizium*. W niniejszej pracy po raz pierwszy dowiedziono, że zarodniki *M. brunneum* ARSEF2107 ze zakumulowanym acetamiprydem powodują podobny efekt owadobójczy wobec larw *Tenebrio molitor* niż 180-krotnie większa dawka samego insektycydu. Zastosowanie praktyczne takiego preparatu pozwoliłoby na zmniejszenie ilości wprowadzanego do środowiska acetamiprydu, ale również destruksyn, które również są rozpatrywane jako czynnik toksyczny zanieczyszczający produkty spożywcze pochodzenia roślinnego.

W kolejnym etapie badań dowiedziono, że grzyby *Cordyceps fumosorosea* ARSEF2679, *C. farinosa* ARSEF1939 i *C. tenuipes* ARSEF2488 efektywnie usuwają zearalenon

Monika Nowak

(ZEN) z podłoża wzrostowego. Analiza ilościowa oraz jakościowa metodą LC-MS/MS umożliwiła identyfikację 19 pochodnych mykotoksyny, w tym zredukowane formy ZEN, utleniony ZEN, zearalenol (ZEL) oraz zearalanol (ZAL), podwójnie utleniony ZEN, metabolity z przyłączonym kwasem glukuronowym, glukozą oraz siarczanem, utlenione glukuronidy ZEN i ZAL oraz utlenione siarczany ZEN i ZEL, które były pochodnymi ksenoestrogenu zidentyfikowanymi po raz pierwszy dla królestwa grzybów w niniejszej pracy. Dowiedziono, że w reakcjach utleniania bierze udział cytochrom P450. Analiza proteomiczna umożliwiła wskazanie enzymów odpowiedzialnych za sulfonowanie, glikozylację oraz redukcję ZEN. Dodatkowo zaobserwowano ogólną nadprodukcję białek zaangażowanych w metabolizm komórkowy, w trakcie ekspozycji na zearalenon. Wykazano, że ZEN w niewielkim stopniu hamował produkcję metabolitu wtórnego – bewerycyny.

W ostatniej pracy badawczej wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano wysoki potencjał *M. anisopliae* ARSEF7487 do eliminacji ZEN oraz deoksyniwalenolu (DON), podczas ekspozycji zarówno na sam ZEN, DON, ZEN i DON razem, jak i mykotoksyny pochodzące z ekstraktu *F. graminearum* DSM4527. *M. anisopliae* biotransformował ZEN poprzez redukcję, utlenianie oraz glukuronidację. Analiza metodą LC-MS/MS dowiodła, że podczas ekspozycji na produkty metabolizmu *F. graminearum*, zawarte w surowym ekstrakcie, *M. anisopliae* redukuje ZEN w przeważającej ilości do β -ZEL i β -ZAL, uważanych powszechnie za związki o obniżonym potencjale estrogennym w stosunku do ZEN. Dowiedziono, że w utlenianie ZEN był zaangażowany cytochrom P450. Ponadto wykazano, że produkcja metabolitów wtórnych u *M. anisopliae* zostaje zaburzona dopiero w czasie ekspozycji na większą ilość czynników toksycznych.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że grzyby entomopatogenne mogą być stosowane nie tylko jako bioinsektycydy, ale również jako czynniki mikrobiologiczne eliminujące zanieczyszczenia środowiska glebowego. Dodatkowo, wyniki te umożliwiają pełniejsze poznanie funkcji ekologicznych pełnionych przez te grzyby w środowisku oraz mechanizmy determinujące ich przystosowanie się do niekorzystnych warunków wzrostowych.

Monika Nowak

Streszczenie w języku angielskim

Entomopathogenic fungi are microorganisms involved in biocontrol of insect populations in the environment. In addition to their widespread occurrence in soils, they are also introduced into ecosystems in the form of bioinsecticides in agriculture limiting the use of chemical insecticides, which are often responsible for adverse effects on non-target organisms. Entomopathogenic fungi in soil environment come into contact with numerous toxic substances of anthropogenic origin and products of metabolism of coexisting organisms.

The dissertation was aimed at evaluating the potential of entomopathogenic fungi to eliminate the neonicotinoid insecticide – acetamiprid, which is used in many insecticide formulations, as well as mycotoxins produced by fungi of the genus *Fusarium*, which pose a toxicological risk and coexist with entomopathogens in the soil environment.

The research study showed for the first time that *Metarhizium* spp. were highly tolerant to acetamiprid. The elimination of acetamiprid from the culture medium proceeded through the accumulation of the insecticide in the mycelium. It was proved that *Metarhizium* spp. secreted less destruxins into the growth medium in the presence of neonicotinoid, which was not related to their retention in the mycelium due to structural changes in cell membranes. It was revealed for the first time that destruxin profiles might be a specific feature for individual species of the genus *Metarhizium*. Also, it was proved for the first time that *M. brunneum* ARSEF2107 spores with accumulated acetamiprid caused the same insecticidal effect against *Tenebrio molitor* larvae as a 180-fold higher dose of the insecticide alone.

In the next stage of the research, it was found that the fungi *Cordyceps fumosorosea* ARSEF2679, *C. farinosa* ARSEF1939 and *C. tenuipes* ARSEF2488 effectively removed zearalenone (ZEN) from the culture medium. Quantitative and qualitative analyses by LC-MS/MS enabled the identification of 19 mycotoxin derivatives, including: reduced forms of ZEN; oxidized ZEN, zearalenol (ZEL) and zearalanol (ZAL); double-oxidized ZEN; metabolites with attached glucuronic acid, glucose and sulfate; oxidized ZEN and ZAL glucuronides; ZEN and ZEL oxidized sulfates, which were xenoestrogen derivatives first identified for the fungal kingdom in this work. Cytochrome P450 was proved to be involved in the oxidation process.

Monika Nowak

Proteomic analysis enabled the identification of enzymes responsible for sulfonation, glycosylation and ZEN reduction. In addition, a general overproduction of proteins involved in cellular metabolism was observed during exposure to zearalenone. It was shown that ZEN slightly inhibited the production of the secondary metabolite – beauvericin.

The last research paper included in the doctoral dissertation showed the high potential of *M. anisopliae* ARSEF7487 to eliminate ZEN and deoxynivalenol (DON), when exposed to ZEN, DON, both ZEN and DON, as well as mycotoxins derived from *F. graminearum* DSM4527 extract. *M. anisopliae* biotransformed ZEN through reduction, oxidation and glucuronidation. The LC-MS/MS analysis showed that during exposure to *F. graminearum* metabolism products contained in the crude extract, *M. anisopliae* reduced ZEN predominantly to β -ZEL and β -ZAL, commonly considered as compounds with lower estrogenic potential in relation to ZEN. Cytochrome P450 was shown to be involved in ZEN oxidation. In addition, it was revealed that the production of secondary metabolites in *M. anisopliae* was disturbed only when fungus was exposed to a larger number of toxic agents.

The conducted research showed the possibility of using entomopathogenic fungi not only as bioinsecticides, but also as microbiological agents involved in the potential elimination of *Fusarium* mycotoxins and acetamiprid. In addition, the mechanisms determining the adaptation of entomopathogenic fungi to unfavorable environmental conditions were determined.

Monika Nowak