

Streszczenie

Pyretroidy to syntetyczne insektycydy, których powszechne użycie prowadzi do zanieczyszczenia środowiska oraz wywiera negatywny wpływ na zdrowie organizmów żywych, w tym ludzi. Alternatywą dla chemicznych środków owadobójczych są grzyby entomopatogenne, stosowane do produkcji przyjaznych dla środowiska biopreparatów. Ponieważ pyretroidy i grzyby entomopatogenne stosuje się wymiennie w biokontroli, mikroorganizmy te są narażone na kontakt z pozostałościami tych substancji, gromadzącymi się w glebie, wodach powierzchniowych oraz osadach. Przewodnim celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie mechanizmów oporności grzyba entomopatogennego *B. bassiana* na insektycydy z grupy pyretroidów.

W artykule przeglądowym P1 (Litwin i in. 2020) przedstawiono charakterystykę grzybów entomopatogennych, opisano proces infekcyjny, zdolności tych mikroorganizmów do usuwania toksycznych zanieczyszczeń oraz możliwości dodatkowego i niekonwencjonalnego ich wykorzystania. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w publikacjach eksperymentalnych P2 (Litwin i in. 2021) oraz P3 (Litwin i in. 2023).

Określono wpływ pyretroidów na wzrost, zarodnikowanie i aktywność metaboliczną *B. bassiana*. Wykazano, że badane substancje w stężeniach 50 i 100 mg L⁻¹ powodują istotny spadek biomasy grzybni oraz liczby blastospor. W obecności pyretroidów nie stwierdzono zmian morfologicznych grzybni ani zaburzeń aktywności metabolicznej tego grzyba entomopatogennego, co może wynikać z nadprodukcji białek biorących udział w organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz enzymów szlaków metabolicznych wykazanych w obecności α -cypermetryny w stężeniu 5 mg L⁻¹.

W dysertacji, po raz pierwszy wykazano, że pyretroidy akumulują się w grzybni *B. bassiana* a także określono zmiany adaptacyjne zachodzące w odpowiedzi na akumulację. Zaobserwowano wpływ metali z komórek grzyba, najprawdopodobniej będący skutkiem wzrostu przepuszczalności błon komórkowych. Ponadto, określono wpływ zakumulowanych substancji na zawartość ergosterolu, uważanego za marker odpowiedzi komórek na substancje toksyczne. W zależności od zastosowanego stężenia oraz użytej substancji następował wzrost lub spadek ilości ergosterolu w komórkach *B. bassiana*. Wykazano znaczne zahamowanie produkcji metabolitu wtórnego oosporeiny w 36-godzinnych hodowlach w obecności pyretroidów. Stwierdzono wpływ pyretroidów na aktywność wewnątrzkomórkowej fosfolipazy C, zaangażowanej w metabolizm komórkowy grzybów entomopatogennych. Zaobserwowano spadek jej aktywności w hodowlach 48-godzinnych oraz w obecności

α -cypermetryny i deltametryny w hodowlach 168-godzinnych. Dodatek λ -cyhalotryny w hodowlach 120-godzinnych powodował wzrost aktywności tego enzymu.

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono wpływ pyretroidów na profil fosfolipidowy oraz zawartość neutralnych lipidów w komórkach *B. bassiana*. Fosfolipidy biorą udział w metabolizmie podstawowym oraz odpowiadają za kondycję błon komórkowych, acyloglicerole natomiast są ważnym elementem szlaku biosyntezy fosfolipidów, jak również zapobiegają powstawaniu reaktywnych form tlenu. W obecności pyretroidów zaobserwowano wzrost stosunku fosfatydylocholiny do fosfatydyloetanolaminy, co sugeruje, że badane związki powodują zwiększenie płynności błon komórkowych. Wykazano, że wpływ pyretroidów na zawartość acylogliceroli zależy od zastosowanego stężenia tych substancji.

W zewnątrzkomórkowym proteomie *B. bassiana* potwierdzono obecność białek zaangażowanych w proces infekcyjny oraz określono wpływ pyretroidów na ich aktywność. Stwierdzono, że wpływ pyretroidów na aktywność enzymów proteo-, lipo- i chitynolitycznych różni się w zależności od użytej substancji oraz od czasu inkubacji. Wykazano również wzrost aktywności lakazy w hodowlach z dodatkiem pyretroidów.

Stwierdzono, że w obecności deltametryny następowała nadprodukcja antygenowego białka podobnego do taumatyny, natomiast w obecności λ -cyhalotryny i α -cypermetryny – nadprodukcja białek odpowiedzialnych za rozwój strzępek i ściany komórkowej.

W proteomie wewnątrzkomórkowym *B. bassiana* zidentyfikowano białka, których produkcja była indukowana obecnością pyretroidów, wykazano wpływ tych substancji na produkcję białek metabolizmu podstawowego, białek odpowiedzi na stres oraz białek opiekuńczych.

Wykazano, że pyretroidy wywołują stres oksydacyjny u grzyba entomopatogennego *B. bassiana* i zaobserwowano wzrost zawartości wolnych rodników, nadprodukcję flawohemoproteiny oraz S-transferazy glutationowej a także zmiany w produkcji katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Wykazano także wzrost aktywności SOD w hodowlach 168-godzinnych z dodatkiem deltametryny.

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.

30.06.2023

Łukasz

Abstract

Pyrethroids are synthetic insecticides, the widespread use of which leads to environmental pollution and has a negative impact on the health of living organisms, including humans. An alternative to chemical insecticides are entomopathogenic fungi, used to produce environmentally friendly biopreparations. Since pyrethroids and entomopathogenic fungi are used interchangeably in biocontrol, the microorganisms are exposed to contact with residues of these substances that accumulate in soil, surface water and sediment. The main objective of this doctoral thesis was to determine the mechanisms of resistance of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* to pyrethroid insecticides.

The review article P1 (Litwin et al. 2020) presents the characteristics of entomopathogenic fungi, describes the infectious process, the ability of these microorganisms to remove toxic impurities and the possibilities of their additional and unconventional use. The results of the conducted research have been presented in experimental publications P2 (Litwin et al. 2021) and P3 (Litwin et al. 2023).

In the study the effect of pyrethroids on the growth, sporulation and metabolic activity of *B. bassiana* was determined. It was shown that the tested substances at concentrations of 50 and 100 mg L⁻¹ cause a significant decrease in mycelium biomass and the number of blastospores. In the presence of pyrethroids, no morphological changes in the mycelium or disturbances in the metabolic activity of this entomopathogenic fungus were observed, which may result from the overproduction of proteins involved in the organization of the actin cytoskeleton and enzymes of metabolic pathways demonstrated in the presence of α -cypermethrin at a concentration of 5 mg L⁻¹.

It was shown for the first time that pyrethroids accumulate in the mycelium of *B. bassiana*. Also the adaptive changes that occurred in response to accumulation were determined. The efflux of metals from the fungal cells was observed, most likely due to an increase in the permeability of the cell membranes. The effect of accumulated substances on the content of ergosterol, considered a marker of cell response to toxic substances, was determined. Depending on the concentration and the substance used, the level of ergosterol in *B. bassiana* cells increased or decreased.

Significant inhibition of oosporein secondary metabolite production was demonstrated in 36-hour cultures in the presence of pyrethroids. It was found that pyrethroids had an influence on the activity of intracellular phospholipase C, involved in the cellular metabolism of entomopathogenic fungi. A decrease in its activity was observed in 48-hour cultures and

in the presence of α -cypermethrin and deltamethrin in 168-hour cultures. The addition of λ -cyhalothrin in 120-hour cultures increased the activity of this enzyme.

The conducted studies confirmed the influence of pyrethroids on the phospholipid profile and the content of neutral lipids in *B. bassiana* cells. Phospholipids are involved in basic metabolism and are responsible for the condition of cell membranes, while acylglycerols are an important element of the phospholipid biosynthesis pathway and prevent the formation of reactive oxygen species. In the presence of pyrethroids, an increase in the ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine was observed, which suggests that the tested compounds enhance the fluidity of cell membranes. It was shown that the effect of pyrethroids on the content of acylglycerols depends on the concentration of these substances used.

The presence of proteins involved in the infection process was confirmed in the extracellular proteome of *B. bassiana*, and the influence of pyrethroids on their activity was determined.

It was found that the effect of pyrethroids on the activity of proteo-, lipo- and chitinolytic enzymes differed depending on the substance used and the incubation time. An increase in laccase activity was also demonstrated in cultures supplemented with pyrethroids.

It was observed that in the presence of deltamethrin there was an overproduction of antigenic thaumatin-like protein, while in the presence of λ -cyhalothrin and α -cypermethrin - overproduction of proteins responsible for the hyphae development and the cell wall was noted. In the intracellular proteome of *B. bassiana*, proteins whose production was induced by the presence of pyrethroids were identified, and the effect of these substances on the production of basic metabolism proteins, stress response proteins and chaperone proteins were demonstrated.

Pyrethroids were shown to induce oxidative stress in the entomopathogenic fungus *B. bassiana*. Also an increase in the reactive oxygen species content, overproduction of flavohemoprotein and glutathione S-transferase, and changes in the production of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were observed. An increase in SOD activity was also demonstrated in 168-hour cultures with the addition of deltamethrin.

Research conducted as part of the doctoral thesis provide evidence of the ability of pyrethroids to accumulate in the mycelium of the entomopathogenic fungus *B. bassiana*. Accumulated pyrethroids, even at relatively low concentrations, were shown to exert a negative impact on the condition of the tested microorganism. Possible mechanisms of resistance of *B. bassiana* to the tested toxic compounds were also presented.

31.01.2023

Litwin Anna