

1. Streszczenie

Lawenda wąskolistna to ceniona roślina lecznicza i ozdobna, uprawiana powszechnie na całym świecie. Produkowane przez nią olejki eteryczne, które są mieszaniną szeregu związków lotnych, szeroko stosowane są w przemysłach kosmetycznym, perfumeryjnym, farmaceutycznym, a także spożywczym, czy tekstylnym, w których w ostatnim czasie szczególną uwagę przywiązuje się związkom pochodzenia naturalnego, uznawanym za bezpieczne dla środowiska i konsumentów. Światowe trendy technologiczno-przemysłowe poszukują alternatyw dla sztucznych, pozyskiwanych chemicznie związków konserwujących, i zapachowych. Zanieczyszczenie środowiska oraz zmniejszające się nieprzerwanie zasoby stanowisk pod uprawy polowe są niejednokrotnie ograniczeniem przy produkcji związków biologicznie czynnych. Z tego właśnie powodu opracowuje się nowe technologie, które będą jak najbardziej wydajne, niezależne od warunków klimatyczno-glebowych i pozwalające na szybką i nieprzerwaną produkcję związków pochodzenia roślinnego. Olejki eteryczne roślin produkowane są przez nie często w niewielkich ilościach lub w szczególnych momentach rozwojowych (m.in. w okresie kwitnienia lub w odpowiedzi na czynniki stresowe). Z powodzeniem do produkcji ich wykorzystywane mogą być roślinne kultury *in vitro*. Za ich sprawą produkowany materiał roślinny jest wolny od zanieczyszczeń oraz chorób i pozbawiony pozostałości środków ochrony roślin. Co więcej, kontrolowane warunki laboratoryjne pozwalają na nieprzerwaną oraz niezależną od czynników środowiskowych produkcję roślin leczniczych bogatych w związki biologicznie czynne. Technika elicytacji może wpływać na wzrost sekrecji olejków eterycznych. Może także prowadzić do uzyskiwania związków o zamierzonym składzie oraz o pożądanых właściwościach i przeznaczeniu. Coraz częściej w procesie elicytacji próbuje się wykorzystywać nanocząstki metali, co do których dowiedziono, że ze względu na swoje właściwości są w stanie wpływać na procesy biologiczne zachodzące w roślinach, w tym na proces produkcji przez nie metabolitów wtórnych (m. in. olejków eterycznych). Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu nanocząstek złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej.

W pierwszym etapie badań zdefiniowano, w jaki sposób dodatek nanocząstek złota (AuNPs) i srebra (AgNPs) do pożywek hodowlanych wpływa na rozwój roślin i trichomy wydzielnicze lawendy wąskolistnej. Pędy roślin namnażano na pożywkach z dodatkiem 1, 2, 5, 10, 20 i 50 mg·dm⁻³ AuNPs lub AgNPs (o średnicy cząstki 24,2 ± 2,4 nm i 27,5 ± 4,8 nm). Oba NPs pozytywnie wpłynęły na wzrost i rozwój roślin w kulturach *in vitro*. Pożywki

z NPs stymulowały tworzenie się pędów i zwiększały masę roślin. Korzenie roślin namnażanych na pożywkach z dodatkiem NPs były zwykle dłuższe niż w kontroli. Jedynie wysokie stężenia NPs (20 i 50 mg·dm⁻³) w pożywkach były toksyczne dla roślin, o czym świadczyło ograniczenie długości pędów i stopniowe obniżanie wartości innych cech morfologicznych. Wzrost stężenia AgNPs powodował zmniejszenie liczby trichomów wydzielniczych. Średnica trichomów wydzielniczych po obu stronach blaszki liściowej była większa, gdy rośliny były namnażane na pożywkach z dodatkiem 1 i 2 mg·dm⁻³ NPs. Średnica trichomów wydzielniczych znajdujących się na adaksjalnej powierzchni blaszki liściowej była największa u roślin pochodzących z podłoża wzbogaconych w 2 mg·dm⁻³ AgNPs i 5 mg·dm⁻³ AuNPs, a najmniejsza w przypadku podłoża wzbogaconych w 5 mg·dm⁻³ AgNPs. Średnica trichomów wydzielniczych tworzących się na powierzchni abaksjalnej była największa u roślin eksponowanych na 1, 2, 5 i 10 mg·dm⁻³ AuNPs, 1 mg·dm⁻³ AgNPs, a najmniejsza u roślin eksponowanych na 5 mg·dm⁻³ AgNPs.

Następnie określono, w jaki sposób dodatek nanocząstek do podłoża hodowlanych wpływa na skład olejków eterycznych lawendy. Rośliny namnażano na podłożach MS z dodatkiem 10 i 50 mg·dm⁻³ nanokoloidów złota (24,2 ± 2,4 nm) i srebra (27,5 ± 4,8 nm). Olejek pozyskany z tkanek lawendy namnażanej na podłożu z dodatkiem 10 mg·dm⁻³ AgNPs różnił się najbardziej w stosunku do kontroli; nie wykryto w nim w ogóle 10 związków, a wykryto 13 innych, które nie występowały w olejku kontrolnym. Dodatek AuNPs i AgNPs do pożywek spowodował zmniejszenie ilości związków o mniejszej masie cząsteczkowej, takich jak: α- i β-pinen, kamfen, δ-3-carene, p-cymen, 1,8-cyneol, trans-pinokarveol, kamforiborneol, które zostały zastąpione przez te o wyższej masie cząsteczkowej (τ- i α-kadynol, 9-cedranon, kadalen, α-bisabolol, cis-14-nor-muuro-5-en-4-on, (E,E)-farnesol).

Zbadano także wpływ nanocząstek złota i srebra na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy askorbinianowej (APX), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy gwajakolowej (POX) i katalazy (CAT)), zdolność do zmiatania wolnych rodników oraz zawartość polifenoli ogółem w lawendzie wąskolistnej. W niniejszym doświadczeniu rośliny lawendy hodowano *in vitro* na podłożu z dodatkiem 1, 2, 5, 10, 20 i 50 mg·dm⁻³ AgNPs lub AuNPs, o rozmiarach cząstek odpowiednio 24,2 ± 2,4 i 27,5 ± 4,8 nm. Stwierdzono, że nanocząstki zwiększają aktywność enzymów antyoksydacyjnych APX i SOD, przy czym reakcja ta zależy od stężenia NPs. Najwyższą aktywność APX stwierdzono u roślin namnażanych na pożywkach wzbogaconych w 2 i 5 mg·dm⁻³ AgNPs. AuNPs istotnie zwiększyły aktywność APX po dodaniu do pożywki w stężeniu 10 mg·dm⁻³. Najwyższą aktywność SOD odnotowano przy stężeniach 2 i 5 mg·dm⁻³ AgNP i AuNP. Dodanie większych

stężeń nanocząstek do pożywek hodowlanych powodowało spadek aktywności APX i SOD. Dodatek AuNPs do pożywek hodowlanych w stężeniach od 2 do 50 mg·dm⁻³ powodowało wzrost aktywności POX, w porównaniu z jej aktywnością po dodaniu AgNPs do pożywek hodowlanych. Nie wykazano istotnego wpływu NPs na wzrost aktywności CAT. AgNPs i AuNPs zwiększały zdolność zmiatania wolnych rodników (ABTS•+). Dodatek NPs w stężeniach 2 i 5 mg·dm⁻³ zwiększał produkcję polifenoli, natomiast w niższych stężeniach obniżał ich zawartość w tkankach lawendy.

Wcześniej uzyskane wyniki były powodem podjęcia próby zweryfikowania właściwości konserwujących lawendy wąskolistnej namnażanej na podłożach z nanocząstkami złota lub srebra o rozmiarach cząstek 13 i 30 nm. Emulsje kosmetyczne przygotowane z wykorzystaniem tkanek lawendy pochodzących z hodowli na podłożach zawierających AuNPs i AgNPs wykazywały zwiększone zdolności konserwujące, w porównaniu z emulsjami kontrolnymi. W przypadku kontrolnych emulsji kosmetycznych, które nie zawierały dodatku tkanek roślinnych oraz DHA BA, kolonie bakterii i grzybów pojawiły się już po drugim tygodniu eksperymentu. Dodatek tkanki lawendy namnożonej na podłożach bez AuNPs lub AgNPs chronił badane próbki przed skażeniem mikrobiologicznym; w tym przypadku skażenie bakteryjne wykryto po 4 tygodniach, a grzybowe po 6 tygodniach. Dodatek tkanki lawendowej pochodzącej z hodowli na pożywkach zawierających AgNPs o wielkości cząstek 13 nm w stężeniu 1 mg·dm⁻³ wydłużył czas pojawiania się kolonii bakteryjnych do 8 tygodni (0,9) i był to wynik zbliżony i porównywalny z działaniem DHA BA. Wyższe stężenie AgNPs w podłożu hodowlanym, jak również większa średnica cząstek (30 nm), powodowały obniżenie zdolności konserwujących tkanek roślinnych. Obecność AuNPs w podłożu hodowlanym wpływała pozytywnie na aktywność przeciwdrobnoustrojową lawendy, jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku AgNPs. Doświadczenie dowiodło, że fragmenty tkanki lawendy pochodzące z podłoży wzbogacanych w 1 mg·dm⁻³ AgNPs, o wielkości cząstek 13 nm mogą być wykorzystywane do konserwacji emulsji kosmetycznych o krótkim terminie przydatności.

Przedstawiona praca doktorska ma charakter aplikacyjny oraz udowadnia zasadność dalszych badań w obszarze wykorzystania nanocząstek złota i srebra do produkcji wysokojakościowego materiału roślinnego, który mógłby być stosowany w przemyśle kosmetycznym, w charakterze naturalnego środka konserwującego.

Paula Yordzok
13.01.2022

2. Abstract

Narrow –Leaved Lavender is a valued medicinal and ornamental plant, widely cultivated all over the world. The essential oils it produces, which are a mixture of a number of volatile compounds, are widely used in cosmetic, perfumery, pharmaceutical, food and textile industries, where special attention has recently been paid to compounds of natural origin, considered safe for the environment and for consumers. Global technological and industrial trends are looking for alternatives to artificial, chemically produced preservative and fragrance compounds. Environmental pollution and the continually decreasing amount of land for field crops are often a limitation in the production of biologically active compounds. For this reason, new technologies are being developed to be as efficient as possible, independent of soil and climatic conditions and allowing rapid and uninterrupted production of compounds of plant origin. Essential oils are often produced by plants in small quantities or in specific moments of development (e.g. during flowering or in response to stress factors). Plant *in vitro* cultures can be successfully used for their production. Thanks to them, the produced plant material is free from contaminants and diseases, and free from plant protection agent residues. Moreover, controlled laboratory conditions allow the production of medicinal plants rich in biologically active compounds to be uninterrupted and independent from environmental factors. The elicitation technique can increase the secretion of essential oils. It can also lead to obtaining compounds with the intended composition and with the desired properties and purpose. More and more often metal nanoparticles are used in the elicitation process. It has been proven that due to their properties they are able to influence biological processes occurring in plants, including production of secondary metabolites (including essential oils). The aim of this dissertation was to determine the effect of gold and silver nanoparticles on the production of secondary metabolites in *in vitro* cultures of narrow-leaved lavender.

As a first step, this study defined how the addition of gold (AuNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles to culture media affects plant development and secretory trichomes of narrow-leaf lavender. Plant shoots were propagated on culture media supplemented with 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg·dm⁻³ AuNPs or AgNPs (particle diameter 24.2 ± 2.4 nm and 27.5 ± 4.8 nm, respectively). Both NPs positively affected plant growth and development in *in vitro* cultures. The media with NPs stimulated shoot formation and increased plant weight. Roots of plants propagated on NPs-supplemented media tended to be longer than in the control. Only high concentrations of NPs (20 and 50 mg·dm⁻³) in the media were toxic to

plants, as evidenced by a reduction in shoot length and a gradual decrease in the values of other morphological traits. An increase in AgNPs concentration resulted in a decrease in the number of secretory trichomes. The diameter of trichomes on both sides of the leaf blade was larger when plants were propagated on media supplemented with 1 and 2 mg·dm⁻³ NPs. The diameter of trichomes located on the adaxial surface of the leaf blade was the largest in plants derived from media enriched with 2 mg·dm⁻³ AgNPs and 5 mg·dm⁻³ AuNPs, and the smallest in media enriched with 5 mg·dm⁻³ AgNPs. The diameter of trichomes formed on the abaxial surface was the largest in plants exposed to 1, 2, 5, and 10 mg·dm⁻³ AuNPs, 1 mg·dm⁻³ AgNPs, and the smallest in plants exposed to 5 mg·dm⁻³ AgNPs.

Next, we determined how the addition of nanoparticles to culture media affects the composition of lavender essential oils. Plants were propagated on MS media supplemented with 10 and 50 mg·dm⁻³ nanocolloids of gold (24.2 ± 2.4 nm) and silver (27.5 ± 4.8 nm). The oil extracted from lavender tissues propagated on medium supplemented with 10 mg·dm⁻³ AgNPs differed the most from the control; 10 compounds were not detected in the oil at all, and 13 others were detected that were not present in the control oil. The addition of AuNPs and AgNPs to the media resulted in a reduction of lower molecular weight compounds (α - and β -pinene, camphene, δ -3-carene, p-cymene, 1,8-cyeneol, trans-pinocarveol, camphoriborneol), which were replaced by those of higher molecular weight (τ - and α -cadinol 9-cedranone, cadalene, α -bisabolol, cis-14-nor-muureol-5-en-4-one, (E,E)-farnesol).

The effects of gold and silver nanoparticles on antioxidant enzyme activities (ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POX), and catalase (CAT)), free radical scavenging capacity, and total polyphenol content of narrow-leaf lavender were also investigated. In the present experiment, lavender plants were grown *in vitro* on medium supplemented with 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg·dm⁻³ AgNPs or AuNPs (with particle sizes of 24.2 ± 2.4 and 27.5 ± 4.8 nm, respectively). Nanoparticles were found to increase the activities of the antioxidant enzymes APX and SOD, with the response depending on the concentration of NPs. The highest APX activity was found in plants grown on media enriched with 2 and 5 mg·dm⁻³ AgNPs. AuNPs significantly increased APX activity when added to the medium at a concentration of 10 mg·dm⁻³. The highest SOD activity was observed at concentrations of 2 and 5 mg·dm⁻³ AgNPs and AuNPs. Addition of higher concentrations of nanoparticles to culture media resulted in a decrease in APX and SOD activities. The addition of AuNPs to the culture media at concentrations

ranging from 2 to 50 mg·dm⁻³ resulted in an increase in POX activity compared to its activity when AgNPs were added to the culture media. There was no significant effect of NPs on the increase in CAT activity. AgNPs and AuNPs increased the free radical scavenging capacity (ABTS•+). The addition of NPs at concentrations of 2 and 5 mg·dm⁻³ increased the production of polyphenols, but at lower concentrations decreased their content in lavender tissues.

Previously obtained results were the reason for an attempt to verify the preservative properties of narrow-leafed lavender grown on media with gold or silver nanoparticles with particle sizes of 13 and 30 nm. Cosmetic emulsions prepared using lavender tissue derived from culture containing AuNPs and AgNPs showed enhanced preservative abilities compared to control emulsions. For the control cosmetic emulsions that did not contain the addition of plant tissue and DHA BA, bacterial and fungal colonies appeared as early as the second week of the experiment. The addition of lavender tissue grown on media without AuNPs or AgNPs protected the trial samples from microbial contamination; in this case, bacterial contamination was detected after 4 weeks and fungal contamination after 6 weeks. The addition of lavender tissue from cultures on media containing AgNPs with a particle size of 13 nm at a concentration of 1 mg·dm⁻³ increased the time for the appearance of bacterial colonies to 8 weeks (0.9) and this was similar and comparable to the effect of DHA BA. The higher concentration of AgNPs in the culture medium, as well as the larger particle diameter (30 nm), resulted in a decrease in the preservative capacity of plant tissues. The presence of AuNPs in the culture medium had a positive effect on the antimicrobial activity of lavender, but to a lesser extent than that of AgNPs. The experiment demonstrates that lavender tissue fragments from media enriched in 1 mg·dm⁻³ AgNPs with a particle size of 13 nm can be used for the preservation of cosmetic emulsions with a short shelf life.

The presented dissertation has an applied character and proves the validity of further research in the area of utilization of gold and silver nanoparticles in the production of high quality plant material, which could be used in the cosmetic industry as a natural preservative.

Paula Jowleżak
13.01.2022

Lublin, 31.03.2022 r.

Dr hab. Grażyna Zawiślak
Katedra Warzywnictwa i Zielerstwa
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauli Jadczak,
pt. „Wpływ nanokoloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych
w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.)”

wykonanej w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Danuty Kulpy, prof. ZUT

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę nr 9 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 31 stycznia 2022 roku.

Wprowadzenie

Nanotechnologia to stosunkowo nowy obszar nauki. Z uwagi na unikatowe właściwości nanomateriałów, dyscyplina ta znajduje zastosowanie w wielu obszarach, m.in. w medycynie, farmacji, kosmetologii. Nanocząstki są przedmiotem ogromnych inwestycji, dlatego wzrost liczby produktów konsumenckich opartych na nanotechnologii postępuje bardzo szybko. Należy wspomnieć również o innych dziedzinach - ogrodnictwo i rolnictwo, w których zastosowanie nanocząsteczek jest widoczne m.in. w ochronie roślin. Do najczęściej stosowanych nanocząsteczek należą: nanosrebro i nanozłoto. Z licznych doniesień literaturowych wynika, że nanokoloidy znalazły zastosowanie w roślinnych kulturach *in vitro*, czego dowodem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska.

Lawenda wąskolistna (*Lavandula angustifolia* Mill.) jest rośliną aromatyczną, szeroko wykorzystywaną w ziołolecznictwie oraz kosmetologii. Podobne znaczenie ma olejek lawendowy, który może być otrzymywany w procesie hydrodestylacji kwiatów lawendy pochodzących z upraw polowych. Autorka prowadząc swoje badania włączyła się w aktualny, światowy nurt nauki nad wtórnymi metabolitami o właściwościach leczniczych, biosyntezy w kulturach tkankowych gatunków roślin z rodziny Lamiaceae. Hodowla

roślin w kulturach *in vitro* zapewnia produkcję materiału roślinnego wolnego od zanieczyszczeń i chorób. Ponadto prowadzone namnażanie roślin w pełni kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, niezależnie od warunków klimatycznych i glebowych i jest możliwa przez cały rok.

Struktura oraz treść rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Pauli Jadczak ma formę monotematycznego zbioru czterech artykułów naukowych pod wspólnym tytułem „Wpływ nanokoloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.)”. Prace naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe to:

1. Jadczak P., Kulpa D., Bihun M., Przewodowski W. 2019. Positive effect of AgNPs and AuNPs in *in vitro* cultures of *Lavandula angustifolia* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. DOI: 10.1007/s11240-019-01656-w (udział własny: 51%, opracowanie koncepcji badań, prowadzenie doświadczeń w kulturach *in vitro* oraz współudział w przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników i pisanie publikacji).
2. Wesołowska A., Jadczak P., Kulpa D., Przewodowski W. 2019. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of essential oils from AgNPs and AuNPs elicited *Lavandula angustifolia in vitro* cultures. Molecules DOI: 10.3390/molecules24030606 (udział własny: 40%, opracowanie koncepcji badań, prowadzenie doświadczeń w kulturach *in vitro* oraz współudział w przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników i pisanie publikacji).
3. Jadczak P., Kulpa D., Drozd R., Przewodowski W., Przewodowska A. 2020. Effect of AuNPs and AgNPs on the antioxidant system and antioxidant activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from *in vitro* cultures. Molecules DOI: 10.3390/molecules25235511 (udział własny: 50%, opracowanie koncepcji badań, prowadzenie doświadczeń w kulturach *in vitro* oraz współudział w przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników i pisanie publikacji).
4. Jadczak P., Kulpa D. 2020. *Lavandula angustifolia* propagated in *in vitro* cultures on media containing AgNPs and AuNPs—an alternative to synthetic preservatives in cosmetics. Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica. DOI: 10.21005/AAPZ2020.56.4.01 (udział własny: 60%, współpraca przy opracowaniu koncepcji badań, współudział w przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników i pisanie publikacji).

Trzy pierwsze prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports i posiadają łączny współczynnik oddziaływania $IF = 8,863$. Sumaryczna liczba punktów dla wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy wynosi 420 punktów według listy czasopism MNiSW. Wszystkie prace opublikowane są w języku angielskim. W trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a dołączone oświadczenia Doktorantki oraz współautorów wskazują na jej wiodącą rolę w opracowaniu koncepcji i hipotezy badawczej, zaplanowaniu i realizacji części eksperymentalnej, analizie statystycznej uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu do publikacji.

Zebrane publikacje poprzedzone są wstępem połączonym z przeglądem literatury, ściśle powiązany z tematem pracy. Autorka bardzo precyzyjnie określa celowość podjętych badań, opisuje badany materiał i stosowane metody oraz zwięźle przedstawia otrzymane wyniki. Następnie kończy tę część rozprawy w postaci 12 wniosków. Ponadto zamieszczony jest spis literatury oraz streszczenia w języku polskim i języku angielskim. Do dysertacji dołączone są kopie czterech oryginalnych prac naukowych składających się na rozprawę doktorską oraz oświadczenia współautorów prac stanowiących podstawę recenzowanego doktoratu.

Należy podkreślić, iż prace wchodzące w skład rozprawy są obszerne, zawierają liczny materiał ilustracyjny, interesujące analizy statystyczne. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu, odpowiednio cytując ją w przedstawianych pracach. Dobór literatury do podejmowanych tematów badawczych świadczy o wysokiej umiejętności korzystania i rozumienia prac naukowych w języku angielskim.

Rozprawa doktorska przygotowana jest bardzo starannie zarówno pod względem językowym, jak i graficznym. Układ poszczególnych rozdziałów jest logiczny i przejrzysty. Treści zawarte w poszczególnych rozdziałach nie budzą żadnych zastrzeżeń i odpowiadają zamieszczonym tytułom.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Oryginalne prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych, o czym świadczy ich Impact Factor oraz przyznane przez MNiSW punkty. Zostały one poddane ocenie kompetentnych recenzentów, dlatego trudno znaleźć poważniejsze uchybienia.

W publikacji nr 1 Doktorantka skupiła się na zbadaniu wpływu nanokolloidów zawierających nanocząsteczki złota lub srebra na rozwój roślin lawendy wąskolistnej

hodowanych w kulturach *in vitro*, w tym także ich wpływ na trichomy wydzielnicze, które są odpowiedzialne za sekrecję olejków eterycznych. Wykazała jednoznacznie możliwość otrzymania dużej ilości tkanek roślinnych lawendy z prawidłowo wykształconymi trichomami wydzielniczymi w wyniku namnażania ich w kulturach *in vitro* na pożywkach uzupełnionych nanokoloidami zawierającymi AgNPs i AuNPs. Rośliny namnażane na wymienionych pożywkach niezależnie od stężenia cechowały się większą świeżą masą, większą liczbą wykształconych pędów oraz dłuższym korzeniem. Dodanie do pożywek niskich stężeń AgNPs tj. 1 i 2 mg·dm⁻³ nie wpływało na wysokość namnażanych roślin lawendy, zaś zwiększenie jego stężenia w pożywce (pow. 5 mg·dm⁻³) wpłynęło na ograniczenie wzrostu roślin i zmniejszenie liczby wykształconych trichomów wydzielniczych i jednocześnie stymulowało rozwój systemu korzeniowego.

Kolejnym zagadnieniem badawczym było określenie zawartości i składu olejku eterycznego (publikacja 2) oraz zawartości polifenoli ogółem (publikacja 3) w tkankach *Lavandula angustifolia* Mill. rosnącej na pożywkach z dodatkiem nanocząsteczek.

Olejek eteryczny jest głównym metabolitem wtórnym lawendy. W warunkach polowych najwięcej olejku lawendowego gromadzą rośliny w okresie kwitnienia. Dzięki kulturom *in vitro* istnieje możliwość produkowania cennego materiału roślinnego, wolnego od zanieczyszczeń w stosunkowo krótszym okresie czasu niż ma to miejsce w uprawach polowych. Analiza składu jakościowego i ilościowego olejku lawendowego z *Lavandula angustifolia* Mill. rosnącej na pożywkach wzbogaconych nanocząsteczkami złota bądź srebra wykazała zróżnicowanie udziału procentowego związków chemicznych w zależności od stężenia i rodzaju nanocząsteczek w pożywce. Obecność w pożywce nanocząsteczek złota i srebra powodowała zmniejszenie udziału związków o niższej masie cząsteczkowej (α - i β -pinenu, kamfenu, δ -3-karenu, p-cymenu, eucaliptolu i borneolu) oraz zwiększenie udziału związków o wyższej masie (α -kadinolu, 9-cendranonu, kadalenu, α -bisabololu, cis-14-nor-muurołu-5-en-4-one, oraz (E,E)-farnesolu). Bardzo interesujące był skład olejku lawendowego z roślin hodowanych na pożywkach kontrolnych, który okazał się bogatszy w takie związki jak: α - i β -pinen, p-cymen, kamfen, δ -3-karenu. Uzyskane wyniki mogą posłużyć jako wskazówka do otrzymywania olejku o określonym składzie chemicznym.

Ogólna zawartość polifenoli w *Lavandula angustifolia* Mill. była modyfikowana rodzajem nanocząsteczek dodawanych do pożywki oraz ich stężeniem w podłożu.

Analizowanym zagadnieniem badawczym w przedłożonej rozprawie było też określenie wpływu nanocząsteczek na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (publikacja

3). Namnażanie lawendy na pożywkach z dodatkiem nanocząsteczek złota i srebra powodowało wzmożoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych (peroksydaza antyaskorbinianowa i dysmutaza ponadtlenkowa) oraz obniżenie aktywności peroksydazy gwajakowej.

Następnym problemem badawczym, jakim zajęła się Doktorantka, była ocena możliwości wykorzystania wysuszonych i sproszkowanych tkanek *Lavandula angustifolia* Mill., elicytowanych w kulturach *in vitro* nanocząsteczkami złota i srebra, jako substancji konserwujących emulsje kosmetyczne (publikacja 4). Wyniki badań wskazują, iż fragmenty tkanki lawendy wąskolistnej pozyskane z podłoża wzbogacanych w 1mg dm^{-3} AgNPs o wielkości cząstek 13 nm mogą zostać wykorzystane do konserwacji emulsji kosmetycznych o krótkim terminie przydatności.

Ocena końcowa

Dysertacja doktorska Pani mgr inż. Pauli Jadczak jest przygotowana z dbałością o stronę językową i edytorską. W całej pracy Doktorantka posługuje się precyzyjnym językiem naukowym oraz swobodnie porusza się w terminologii dotyczącej prezentowanych zagadnień.

W pracy znalazły się jedynie pewne nieścisłości, które nie pomniejszają wysokiej wartości merytorycznej recenzowanej pracy. Wśród nich można wymienić:

- str. 20 błąd we wniosku 2, gdzie słowo „wyższą” w stwierdzeniu:charakteryzowały się wyższą świeżą masą....należało by zastąpić słowem większą, które jest bardziej adekwatne do masy
- str. 30, 9.Jednotematyczny cykl publikacji – można dodać numery czasopism oraz strony, mimo widniejących numerów DOI
- str. 30, 9.Jednotematyczny cykl publikacji – przy publikacji 4 rok wydania przesunięty został za tytuł artykułu.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Pauli Jadczak, pt. „Wpływ nanokoloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.)” jest bardzo interesująca, ma charakter aplikacyjny, udowadnia zasadność prowadzenia dalszych badań w obszarze wykorzystania nanocząsteczek złota i srebra do produkcji wysokojakościowego materiału roślinnego z zastosowaniem w przemyśle kosmetycznym jako naturalnego środka konserwującego.

Doktorantka na podstawie precyzyjnie zaplanowanych oraz starannie

przeprowadzonych eksperymentów wykazała użyteczność wybranych metod.

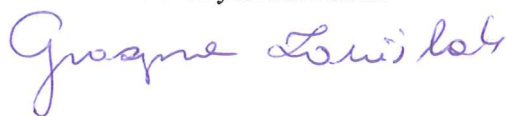
Rozprawa doktorska została wykonana w dyscyplinie naukowej ogrodnictwo.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym oraz spełnia wymagania określone na podstawie art. 179 ust. 1 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, późn. zm.) w związku z art. 14 ust. 2 pkt 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, późn. zm.).

Wnioskuje do Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauli Jadczyk i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na istotne walory oryginalności naukowej oraz mając na uwadze wysoką jakość uzyskanych wyników i wiodącą rolę Doktorantki w powstawaniu publikacji naukowych wnoszę do Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Dr hab. Grażyna Zawiaślak





**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Dr hab. Justyna Lema-Rumińska, prof. PBS
Pracownia Roślin Ozdobnych i Warzywnych
Katedra Przyrodniczych Podstaw Rolnictwa i Ogrodnictwa
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Pauli Jadczak

**pt. „Wpływ nanokoloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych
w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.)”**

Ocena rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie uchwały nr 9 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, przekazanej pismem z dnia 3. lutego 2022 r. przez Pana prof. dr hab. inż. Arkadiusza Telesińskiego, Dziekana Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Pauli Jadczak**, przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Danuty Kulpy, prof. ZUT w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie, składa się z jednotematycznego cyklu publikacji zgodnie z art. 15 Ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2016, poz. 882) pod wspólnym tytułem: Wpływ nanokoloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.). W skład cyklu wchodzi 4 publikacje naukowe opublikowane w latach 2019-2020. Trzy artykuły wchodzące w skład rozprawy opublikowano w czasopiśmie z tzw. Listy Filadelfijskiej (jeden w Plant Cell Tissue and Organ Culture oraz dwa w Molecules), a jeden w czasopiśmie *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis*. Łączna wartość osiągnięcia mierzona współczynnikiem wpływu *Impact Factor* (IF) wynosi 8,863 oraz 420 punktów z listy MEiN. Przedstawione do oceny publikacje są wieloautorskie lub dwuautorskie, jednak w trzech pracach Pani Mgr inż. Paula Jadczak jest pierwszym autorem, a w jednej drugim, co świadczy o istotnym wkładzie w powstanie tych prac (udział 40-60%), ponadto w dwóch pracach Doktorantka jest także autorem korespondencyjnym. Praca doktorska składa się z dziewięciu rozdziałów. Jednotematyczny cykl publikacji poprzedzony jest opisem składającym się z ośmiu rozdziałów (1 - Wstęp, 2 - Cel badań, 3 – Materiał i metody badań, 4 - Omówienie wyników badań przedstawionych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe, 5 - Wnioski, 6 - Literatura, 7 - Streszczenie, 8 - Abstract, 9 - Jednotematyczny cykl publikacji).

Temat rozprawy został trafnie określony i spaja cały cykl publikacji dotyczący wpływu nanokoloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej.

We Wstępie Doktorantka określiła znaczenie nanocząstek metali zarówno w medycynie i farmacji, kosmetologii, ochronie środowiska, przemyśle tekstylnym, jak i na komórce roślinnej, gdzie przyczyniają się do peroksydacji błon komórkowych i wpływają na ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję związków aktywnych biologicznie. Ponadto Autorka zwróciła uwagę na zastosowanie nanocząstek, głównie srebra, w roślinnych kulturach *in vitro* na etapie zakładania sterylnej kultury oraz badań nad ich przydatnością jako elicytorów pobudzających produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro*. Omówiła ponadto gatunek lawendę wąskolistną jako roślinę wykorzystywaną do produkcji cennych olejków eterycznych oraz przedstawiła teorie prawdopodobnego mechanizmu oddziaływania nanocząstek dodawanych do pożywek w kulturach *in vitro* na produkcję metabolitów wtórnych.

Głównymi celami prezentowanej rozprawy doktorskiej było: określenie wpływu dodatku do pożywki nanokoloidów zawierających nanocząstki złota i srebra na wzrost roślin, w tym rozwój trichomów wydzielniczych lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.), odmiany 'Munstead' w kulturach *in vitro*. Ocena składu chemicznego olejków eterycznych oraz zawartości polifenoli ogółem, produkowanych przez lawendę wąskolistną namnażaną w kulturach *in vitro* na pożywkach wzbogaconych w nanokoloidy złota lub srebra. Ponadto badania dotyczyły określenia wpływu nanocząstek złota i srebra na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i zdolność do zmiatania wolnych rodników w tkankach roślin lawendy wąskolistnej namnażanych w kulturach *in vitro* i oceny możliwości wykorzystania tkanek lawendy wąskolistnej w kulturach *in vitro* na pożywkach zawierających w swoim składzie nanocząstki złota lub srebra jako alternatywy dla syntetycznych konserwantów używanych w produktach kosmetycznych.

Opracowanie wydajnej metody otrzymywania olejków eterycznych lub też fragmentów tkanek roślin o istotnie podwyższonej w wyniku elicytacji aktywności antyoksydacyjnej i antymikrobiologicznej, pozwoliłoby na ich wykorzystanie jako substancji konserwujących kosmetyki, zwłaszcza tych o krótkim terminie przydatności do użycia. Podjęta problematyka badawcza jest istotna ze względu na poszukiwanie alternatywnych substancji pochodzących z roślin, które mogłyby zastąpić w praktyce kosmetycznej substancje chemiczne prowadzące często do problemów alergicznych skóry. Zwiększenie wydajności ich wytwarzania w kulturach *in vitro* roślin poprzez elicytację może dostarczyć bardzo wysokiej jakości fitozwiązków o charakterze aplikacyjnym w szeroko pojętej kosmetyce.

W rozdziale 3 Doktorantka przedstawiła charakterystykę materiału badawczego oraz metody badawcze. Materiałem użytym do prowadzenia badań w ramach wykonanej pracy doktorskiej były rośliny lawendy wąskolistnej, odmiany 'Munstead' pochodzące z kolekcji roślin Laboratorium Kultur *In Vitro*, Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, mieszczącej się na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa ZUT w Szczecinie. Eksplantaty pobrane z tych roślin posłużyły do założenia doświadczenia, w którym określono:

wpływ nanocząstek złota i srebra dodawanych do pożywki podstawowej w różnych stężeniach (od 1 do 50 mg·dm⁻³) na wzrost i rozwój roślin lawendy w kulturach *in vitro*. Obserwacje prowadzono przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), określono również morfologię wykształconych trichomów wydzielniczych (**publikacja 1**). W otrzymanych w ten sposób tkankach lawendy oznaczono aktywność enzymów antyoksydacyjnych (POX, APX, CAT, SOD), zdolność do zmiatania wolnych rodników metodą ABTS•+ oraz zawartość polifenoli ogółem (**publikacja 3**). Następnie porównano zawartość olejku eterycznego i jego skład (metodą GC-MS) w tkankach lawendy wąskolistnej namnażanej na pożywce podstawowej, z dodatkiem AgNPs lub AuNPs (**publikacja 2**).

Na ostatnim etapie pracy doktorskiej (**publikacja 4**) porównano potencjał konserwujący emulsje kosmetyczne tkanek lawendy wąskolistnej w kulturach *in vitro*, na pożywkach wzbogaconych w 1 lub 10 mg·dm⁻³ nanocząstki złota lub srebra o dwóch wielkościach cząstek 13 lub 30 nm.

Analizę trichomów wydzielniczych liści za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) przeprowadzono w Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Szczecińskiego w Małkocinie. Badania mające na celu określenie stężenia i kompozycji olejków eterycznych wykonano na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT w Szczecinie.

W kolejnym rozdziale Doktorantka omówiła wyniki badań zawartych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe.

W **publikacji nr 1** pt. „Positive effect of AgNPs and AuNPs in *in vitro* cultures of *Lavandula angustifolia* Mill.” opublikowanej w czasopiśmie Plant Cell, Tissue and Organ Culture Doktorantka wraz ze współautorami badała wpływ nanokoloidów zawierających nanocząstki złota lub srebra na rozwój roślin lawendy wąskolistnej w kulturach *in vitro*, w tym także ich wpływ na trichomy wydzielnicze odpowiedzialne za sekrecję olejków eterycznych. Wyniki powyższych badań wskazują na istotny wpływ AuNPs i AgNPs na liczbę i średnicę trichomów wydzielniczych na dolnej i górnej powierzchni blaszek liściowych lawendy. Niskie stężenia NPs zwiększały liczbę wykształconych trichomów wydzielniczych. Najliczniej struktury te występowały na blaszkach liściowych lawendy namnażanej na pożywkach zawierających 5 mg·dm⁻³ AuNPs. Lawenda namnażana na pożywkach z dodatkiem najwyższych stężeń AgNPs (50 mg·dm⁻³) wykształciła najmniejszą liczbę trichomów, na obu stronach blaszek liściowych. Wyższe stężenia NPs nie zwiększały średnicy włosków wydzielniczych na górnej powierzchni blaszek liści lawendy w porównaniu z pożywką kontrolną. Na zwiększenie się średnicy trichomów wydzielniczych w stosunku do kontroli na dolnej powierzchni blaszki liściowej wpłynęły od 1 do 10 mg·dm⁻³ AuNPs oraz 1 mg·dm⁻³ AgNPs dodawane do pożywek wzrostowych.

W kolejnym doświadczeniu określono zawartość i skład metabolitów wtórnych - olejków eterycznych (**publikacja nr 2** pt. „Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of Essential Oils from AgNPs and AuNPs Elicited *Lavandula angustifolia* *In Vitro* Cultures” opublikowanej w *Molecules*). Celem doświadczenia była analiza olejków eterycznych, pozyskanych z roślin lawendy wąskolistnej namnażanej w kulturach *in vitro* na

pożywkach wzbogacanych w nanocząstki złota bądź srebra. W pracy tej dowiedziono, że uprawa lawendy wąskolistnej w kulturach *in vitro* na pożywkach zawierających w swoim składzie nanocząstki złota i srebra istotnie wpływa na skład chemiczny i zawartość olejków eterycznych. Analiza składu olejków metodą GC-MS umożliwiła zidentyfikowanie 97 różnych związków chemicznych reprezentujących, w zależności od stężenia nanocząstek od 99,29-99,95% zawartości olejków eterycznych. Stwierdzono zróżnicowanie udziału procentowego związków chemicznych w analizowanych olejkach eterycznych, w zależności od stężenia i rodzaju nanocząstek w pożywce. Nanocząstki złota i srebra dodawane do pożywek powodowały zmniejszenie ilości i udziału procentowego związków o niższej masie cząsteczkowej, które zostały zastąpione przez te o wyższej masie cząsteczkowej. Olejki eteryczne pozyskane z tkanek lawendy uprawianej na pożywkach z dodatkiem 10 mg·dm⁻³ AgNPs najbardziej różniły się jakościowo w odniesieniu do kontroli.

Doświadczenie dowodzi, że nanocząstki złota i srebra spełniają funkcję elicytorów w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej, istotnie wpływając na zawartość i skład produkowanych przez nią olejków eterycznych. Nie jest jednak jasne jaki jest mechanizm oddziaływania nanocząstek dodawanych do pożywek w kulturach *in vitro* na produkcję metabolitów wtórnych. Przypuszcza się, że nanocząstki metali wywołują stres oksydacyjny. Dlatego w kolejnym doświadczeniu określono wpływ nanocząstek na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (**publikacja 3** pt. „Effect of AuNPs and AgNPs on Antioxidant System and Antioxidant Activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from *In Vitro* Cultures” opublikowanej w *Molecules*). Celem badania było określenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych lawendy wąskolistnej (APX, SOD, POX, CAT) narażanej na stres wywołany nanocząstkami złota i srebra oraz jej zdolność do zmiatania wolnych rodników (ABTS•+) i zawartość polifenoli ogółem.

Stwierdzono, że nanokolidy złota i srebra zwiększają aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak peroksydaza askorbinianowa (APX) i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), jednak reakcja ta zależy od ich stężenia w pożywce. Najwyższą aktywność APX stwierdzono w tkankach roślin namnażanych na podłożach zawierających 2 i 5 mg·dm⁻³ AgNPs. Nanocząstki złota istotnie zwiększały aktywność APX w stosunku do kontroli, jedynie kiedy zastosowane były w stężeniu 10 mg·dm⁻³. Najwyższą aktywność SOD zaobserwowano przy stężeniu 2 i 5 mg·dm⁻³ AgNP i AuNPs. Dodatek AgNPs do podłoża hodowlanych we wszystkich zastosowanych stężeniach oraz 1 mg·dm⁻³ AuNPs obniżył aktywność peroksydazy gwajakolowej (POX), w porównaniu do aktywności obserwowanej u roślin kontrolnych. Nie wykazano istotnego wpływu nanocząstek na wzrost aktywności katalazy (CAT) w stosunku do kontroli.

Zawartość polifenoli ogółem zmieniała się w zależności od rodzaju i stężenia nanocząstek w pożywce. Wzrost zawartości polifenoli w stosunku do kontroli stwierdzono dla lawendy namnażanej na pożywkach z dodatkiem 2, 5 i 10 mg·dm⁻³ AuNPs oraz od 5 do 50 mg·dm⁻³ AgNPs. Z kolei lawenda uprawiana na podłożach z dodatkiem najwyższego stężenia nanocząstek złota (50 mg·dm⁻³) oraz najniższych stężeń nanocząstek srebra (1 i 2 mg·dm⁻³) charakteryzowała się istotnie niższą od kontroli zawartością polifenoli.

Mając na uwadze aplikacyjny charakter pracy doktorskiej, w kolejnym etapie badań określono możliwość zastosowania wysuszonych i sproszkowanych fragmentów roślin lawendy, elicytowanych w kulturach *in vitro* nanocząstkami Ag i Au, jako substancji konserwujących emulsje kosmetyczne (**publikacja 4 pt.** „*Lavandula angustifolia* propagated in *in vitro* cultures on media containing AgNPs and AuNPs: an alternative to synthetic preservatives in cosmetics” opublikowanej w *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis*). Celem ostatniego etapu badań było określenie możliwości wykorzystania rozdrobnionych tkanek lawendy wąskolistnej uzyskanych na podłożach zawierających nanocząstki złota lub srebra o rozmiarach 13 i 30 nm do konserwacji emulsji kosmetycznych. Wykazano, że tkanki lawendy uprawianej na podłożach zawierających AuNPs i AgNPs wykazały zadowalające zdolności konserwujące. W przypadku emulsji kosmetycznych kontrolnych, które nie zawierały dodatku tkanek roślinnych ani kwasu dehydrooctowego i benzoowego, zaobserwowano pojawianie się kolonii bakteryjnych i grzybowych po drugim tygodniu trwania doświadczenia. Dodatek tkanek lawendy uprawianej na pożywkach nie zawierających nanocząstek chronił badane próbki przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym. W tym przypadku kolonie bakteryjne zostały wykryte po 4 tygodniach, a grzybowe po 6 tygodniach inkubacji. Dodatek tkanki lawendy rosnącej na podłożach uzupełnionych w AgNPs o wielkości cząstek 13 nm oraz w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wydłużył czas pojawiania się kolonii bakteryjnych do 8 tygodni, a wynik ten był porównywalny z efektem konserwującym DHA BA. Wyższe stężenie AgNPs w pożywce, a także większa średnica cząstek (30 nm), spowodowały zmniejszenie zdolności konserwujących tkanek roślinnych. Obecność AuNPs w pożywkach także wykazała pozytywny wpływ na aktywność antymikrobiologiczną lawendy, jednak w mniejszym stopniu niż w przypadku AgNPs. Autorka sugeruje, że rozdrobnione fragmenty tkanki lawendy, pozyskane z roślin uprawianych na pożywkach zawierających $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AgNPs o wielkości cząstek 13 nm mogą być wykorzystane do konserwacji emulsji kosmetycznych o krótkim okresie przydatności do użycia.

Konstrukcja pracy jest przejrzysta i logiczna. Tematy podejmowane w kolejnych publikacjach wynikają z rezultatów badań uzyskanych w poprzednich pracach i są ich rozwinięciem. Przedstawione prace świadczą o dużej wiedzy Pani mgr inż. Pauli Jadczak, bardzo dobrej umiejętności dyskusji i interpretacji wyników oraz formułowania syntetycznych wniosków. Istotny jest również potencjalnie aplikacyjny charakter pracy, gdyż uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania nanocząstek złota i srebra jako elicytorów zwiększających w roślinach zawartość cennych substancji o charakterze metabolitów wtórnych uzyskanych metodą roślinnych kultur *in vitro* do produkcji wysokiej jakości naturalnych kosmetyków.

Do najważniejszych wniosków rozprawy doktorskiej Pani Mgr inż. Pauli Jadczak należy zaliczyć:

a/ Wykazanie możliwości otrzymania dużej ilości tkanek roślinnych (rośliny rozmnażane na pożywkach z dodatkiem nanokoloidów zawierających AgNPs i AuNPs, niezależnie od ich

stężenia w pożywce, charakteryzowały się wyższą świeżą masą i liczbą wykształconych pędów oraz dłuższym korzeniem) z prawidłowo wykształconymi trichomami wydzielniczymi.

b/ Stwierdzenie, że dodatek do pożywek niskich stężeń AgNPs (1 i $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) nie wywierał wpływu na wysokość namnożonych roślin. Zwiększenie jego stężenia w pożywce powyżej $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wpłynęło na ograniczenie wzrostu roślin i zmniejszenie liczby wykształconych trichomów wydzielniczych, a jednocześnie stymulowało rozwój systemu korzeniowego.

c/ Stwierdzenie, że namnażanie lawendy w kulturach *in vitro* na pożywkach z dodatkiem od 1 do $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AuNPs wpłynęło na zwiększenie liczby wykształconych trichomów wydzielniczych.

d/ Wykazanie, że najważniejszymi związkami występującymi w olejkach eterycznych lawendy wąskolistnej uzyskanej *in vitro* były: borneol, τ -kadinol, tlenek kariofilenu, γ -kadinen i 1,8-cineol.

e/ Stwierdzenie, że nanocząstki złota i srebra dodawane do pożywek miały wpływ na skład chemiczny olejków eterycznych.

f/ Wykazanie, że olejek eteryczny pozyskany z tkanek lawendy hodowanej na pożywkach z dodatkiem $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AgNPs najbardziej różnił się jakościowo w odniesieniu do kontroli. W jego składzie zidentyfikowano 13 związków chemicznych nieobecnych w olejku izolowanym z roślin kontrolnych.

g/ Wykazanie, że namnażanie lawendy wąskolistnej na pożywkach z dodatkiem nanocząstek złota i srebra skutkowało wzmożoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych takich jak: peroksydaza askorbinianowa (APX) i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), wpływając zaś na obniżenie się aktywności peroksydazy gwałajakolowej POX. Poziom aktywności enzymów zależał od stężenia i rodzaju nanocząstki.

i/ Stwierdzenie, że dodatek do pożywek namnażających nanocząstek w stężeniu od 1 do $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AuNPs oraz od 2 do $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AgNPs zwiększał aktywność antyoksydacyjną określoną przez zdolność do zmiatania wolnych rodników ABTS $\bullet$ +. Wyjątek stanowiło tu najniższe stężenie AgNPs ($1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz najwyższe stężenie AuNPs ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), których zdolność pozostawała na poziomie kontroli.

j/ Określenie rodzaju nanocząstek dodawanych do pożywki oraz ich stężenia w pożywce które wpływa na zawartość w tkankach polifenoli ogółem. Rośliny namnażane na pożywkach z dodatkiem od 2 do $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AuNPs oraz od 5 do $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AgNPs charakteryzowały się wyższą zawartością polifenoli ogółem w porównaniu z kontrolą.

k/ Wykazanie, że tkanki lawendy wąskolistnej namnażanej na pożywkach wzbogaconych w $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ nanocząstek srebra o wielkości cząsteczki 13 nm wykazywały właściwości konserwujące, zabezpieczając emulsje kosmetyczne przed zanieczyszczeniem mikrobiologicznym przez okres do 6 tygodni, a po okresie 8 tygodni obserwowano jedynie niewielki wzrost mikroorganizmów.

1/ Stwierdzenie, że fragmenty tkanki lawendy pochodzące z podłoży wzbogacanych w $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ AgNPs o wielkości cząstek 13 nm mogą być z powodzeniem wykorzystywane do konserwacji emulsji kosmetycznych o krótkim terminie przydatności.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiony cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Wpływ nanokolloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.) stanowi dobrą podstawę do ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie naukowej rolnictwo i ogrodnictwo.

Podczas lektury pracy nasunęło mi się jednak kilka pytań i uwag.

Uwagi:

1. W pracy zauważono drobne literówki oraz tautologie np. „pożywka ta stanowiła pożywkę”.
2. W pracy doktorskiej pojawiają się określenia typu: „hodowla roślin w kulturach *in vitro*” oraz „tkanek hodowanych w kulturach *in vitro*” itp. Proszę wyjaśnić dlaczego użyto tu słowa „hodowla” a nie „uprawa”?
3. Z Pani rozprawy doktorskiej wynika, że: „Dodatek tkanki lawendy rosnącej na podłożach uzupełnionych w AgNPs o wielkości cząstek 13 nm oraz w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wydłużył czas pojawiania się kolonii bakteryjnych do 8 tygodni, a wynik ten był porównywalny z efektem konserwującym DHA BA”.

Z literatury naukowej wiadomo, że nanocząstki metali m. in. srebra i złota mogą mieć działanie cytotoksyczne i genotoksyczne. Czy stosowanie ich w kosmetykach jest bezpieczne dla konsumentów? Od czego może zależeć cyto- i genotoksyczność na żywe komórki? Jaka średnica nanocząstek umożliwia ich penetrację przez błony komórkowe do wnętrza komórki i organelli komórkowych? Czy wykonano odpowiednie badania toksykologiczne emulsji zawierających nanocząstki srebra lub złota na tkanki/ komórki skóry ludzkiej w warunkach *in vitro*?

Pragnę zaznaczyć, że powyższe uwagi to drobne nieścisłości, głównie redakcyjne, które nie wpływają na merytoryczną ocenę pracy.

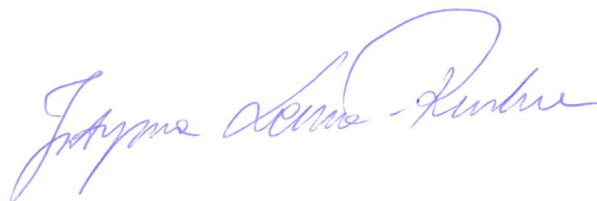
Podsumowanie

Podsumowując, niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **Pani Mgr inż. Pauli Jadczak pt. „Wpływ nanokolloidów złota i srebra na produkcję metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* Mill.)”** spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. 2017, poz. 1789, z późn. zm.) oraz § 11 ust. 6 uchwały

nr 113 Senatu ZUT z dnia 23 września 2019 roku (z późn. zm.). Z tego względu przedkładam wniosek do Wysokiego Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie **Pani Mgr inż. Pauli Jadczak** do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Biorąc pod uwagę wartość naukową recenzowanej pracy oraz ze względu na fakt, że przedstawiony spójny tematycznie cykl publikacji składa się z wysokopunktowanych artykułów (wg MEiN 420 punktów) o łącznym współczynniku wpływu IF = 8,863, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału o **wyróżnienie powyższej rozprawy**.

Bydgoszcz, 4.04.2022 r.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jadczak Pauli', is written in a cursive style.

Uchwała nr 143

Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 27 czerwca 2022 r.

w sprawie nadania mgr inż. Pauli Jadczak stopnia doktora

Na podstawie art. 179 ust. 1 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.) w związku z art. 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.) uchwała się, co następuje:

§ 1.

Senat Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie nadaje mgr inż. Pauli Jadczak stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Senatu
Rektor

dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. ZUT