

## 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 pożądanym 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup>) 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<sup>-3</sup> NPs. Średnica trichomów wydzielniczych znajdujących się na adaksjalnej powierzchni blaszki liściowej była największa u roślin pochodzących z podłoża wzbogaconych w 2 mg·dm<sup>-3</sup> AgNPs i 5 mg·dm<sup>-3</sup> AuNPs, a najmniejsza w przypadku podłoża wzbogaconych w 5 mg·dm<sup>-3</sup> AgNPs. Średnica trichomów wydzielniczych tworzących się na powierzchni abaksjalnej była największa u roślin eksponowanych na 1, 2, 5 i 10 mg·dm<sup>-3</sup> AuNPs, 1 mg·dm<sup>-3</sup> AgNPs, a najmniejsza u roślin eksponowanych na 5 mg·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> nanokolloidów 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<sup>-3</sup> 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-muurol-5-en-4-on, (E,E)-farnesol).

Zbadano także wpływ nanocząstek złota i srebra na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy askorbinianowej (APX), dysmutazy ponadtlenukowej (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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> AgNPs. AuNPs istotnie zwiększyło aktywność APX po dodaniu do pożywki w stężeniu 10 mg·dm<sup>-3</sup>. Najwyższą aktywność SOD odnotowano przy stężeniach 2 i 5 mg·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup>) 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> AgNPs and 5 mg·dm<sup>-3</sup> AuNPs, and the smallest in media enriched with 5 mg·dm<sup>-3</sup> AgNPs. The diameter of trichomes formed on the abaxial surface was the largest in plants exposed to 1, 2, 5, and 10 mg·dm<sup>-3</sup> AuNPs, 1 mg·dm<sup>-3</sup> AgNPs, and the smallest in plants exposed to 5 mg·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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 ( $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, camphene,  $\delta$ -3-carene, p-cymene, 1,8-cyeneol, trans-pinocarveol, camphorborneol), which were replaced by those of higher molecular weight ( $\tau$ - and  $\alpha$ -cadinol 9-cedranone, cadalene,  $\alpha$ -bisabolol, cis-14-nor-muurol-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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> AgNPs. AuNPs significantly increased APX activity when added to the medium at a concentration of 10 mg·dm<sup>-3</sup>. The highest SOD activity was observed at concentrations of 2 and 5 mg·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> 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 Joudzaks  
13.01.2022