



جامعة الموصل
كلية العلوم

الانتاج الحيوي لجزيئات الفضة النانوية من الكالس والخلايا المعلقة لنبات
الحبة السوداء *Nigella sativa* L. المعرضة للمجال المغناطيسي

سوسن جمال انور سليمان العلاف

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم النبات

باشراف

الاستاذ المساعد الدكتورة

رحاب عبد الجبار حامد البكر

الخلاصة

هدفت الدراسة في محورها الأول معرفة تأثير المجال الكهرومغناطيسي بشدة (400 ملي تسلا) ولأوقات زمنية مختلفة (0، 30، 60، 90، 120، 150) دقيقة في نسبة إنبات البذور ونمو بادرات نبات الحبة السوداء *Nigella sativa* وعلى استحداث ونمو الكالس وبعض المؤشرات الكيموحيوية المختلفة في الكالس كذلك محتواه من العناصر الغذائية المهمة، وكذلك التحري عن تأثير المجال المغناطيسي في معدل تراكم مركب الثايمول (Thymol) في أنسجة مزارع الكالس باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائل فائق الأداء (HPLC).

أثبتت الدراسة الحالية الدور التحفيزي للمجال المغناطيسي في تحفيز إنبات البذور ونمو البادرات لتصل نسبة الإنبات الى 96% عند مدة تعريض 90 دقيقة مقارنة بالعينة القياسية وبلغ معدل أطوال السيقان والجذور للبادرات (9.5، 7.5 سم) على التوالي ولنفس مدة التعريض، وكذلك في زيادة نسبة إستحداث الكالس إذ بلغت أعلى نسبة استحداث 99% عند تعريض قطع بادرات الحبة السوداء (2 سلامة+1 عقدة) الى المجال المغناطيسي لمدة 30 دقيقة.

كذلك بينت النتائج تأثيراً إيجابياً ملحوظاً للمجال المغناطيسي في زيادة المؤشرات الكيموحيوية المدروسة للكالس إذ سجل الكالس أفضل نمو بنسبة 99.2% وأعلى وزن رطب 5.3غم عند تعريضه للمجال المغناطيسي لمدة 90 دقيقة، كما أظهرت النتائج أن للمجال المغناطيسي دوراً واضحاً في رفع حيوية الكالس وكمية البروتين والسكريات الذائبة لتصل أعلى مستوياتها (95%)، 52ملغم/غم، 122ملغم/غم) على التوالي في الكالس المعرض للمجال المغناطيسي لمدة 90 دقيقة.

بدا تأثير المجال المغناطيسي واضحاً على النظام المضاد للأكسدة في مزارع الكالس، إذ سبب إرتفاع محتوى البرولين وأنزيمي الكتاليز CAT والبيروكسيداز POD بالتزامن مع زيادة مدة التعرض للمجال المغناطيسي الى 150 دقيقة ليصل عندها أعلى تركيز للبرولين (11 مايكروغرام/غم) وأعلى نشاط أنزيمي للكتاليز والبيروكسيداز (0.749 و 0.590 وحدة/مل) على التوالي بعد 5 ايام و (0.950 و 0.739 وحدة/مل) بعد 25 يوم من التعريض.

وكان للمجال المغناطيسي تأثيراً متبايناً على توافر بعض العناصر الغذائية في مزارع الكالس، إذ زادت تراكيز كل من عناصر الزنك Zn والمغنيسيوم Mg والمنغنيز Mn والبوتاسيوم K والصوديوم Na مع زيادة التعرض للمجال المغناطيسي لتسجل أعلى تركيز عند مدة تعرض 90 دقيقة، في حين قلّ تركيز عنصر الحديد Fe والنحاس Cu عن العينة القياسية عند التعريض للمجال المغناطيسي بشدة 400 ملي تسلا.

لم يحدث المجال المغناطيسي تغييراً ملحوظاً في تراكم مركب الثايمول Thymol في مزارع كالس الحبة السوداء في عمره الأول (3 يوم) إذ بدأ تركيزه بالانخفاض عند التعرض للمجال المغناطيسي

مقارنة بمزارع الكالس القياسية غير المعرضة للمجال المغناطيسي إذ بلغ تركيز الثايمول فيه (5.51862 ملغم/مل).

أولت الدراسة الحالية في محورها الثاني الإهتمام بإنتاج جسيمات الفضة النانوية silver nanoparticles (AgNPs) خضرياً ولأول مرة عالمياً من مزارع كالس نبات الحبة السوداء *Nigella sativa L.* (القياسية والمعرضة للمجال المغناطيسي لمدة 90 دقيقة والمزارع المعلقة) للنبات، وتضمنت الدراسة التحري عن قابلية مزارع الكالس القياسية والمعرضة للمجال المغناطيسي والمزارع المعلقة الخلوية على تخليق دقائق الفضة وبيان تأثير اختلاف درجة الحمضية pH للمستخلصات على عملية توليف جسيمات الفضة النانوية.

ولإثبات وجود دقائق الفضة النانوية بشكل مبدئي تم استخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية Spectrophotometer UV-Vis والذي أظهر ذروة امتصاص تراوحت بين (400-440 نانومتر) ناتجة عن ظاهرة انعكاس سطح البلازمون لجسيمات الفضة النانوية.

ولأجل توصيف جسيمات الفضة النانوية المنتجة في المزارع المختلفة استخدم المجهر الإلكتروني الماسح Scanning Electron Microscopy (SEM) لمعرفة شكل وحجم دقائق الفضة النانوية إذ أظهرت هذه التقنية اجساماً للدقائق النانوية تراوحت بين (18.341 - 40.932 نانومتر بالنسبة للمستخلصات القياسية و(22.585 - 42.2 نانومتر لمستخلصات الكالس المعرض للمجال المغناطيسي لمدة 90 دقيقة بشدة 400 ملي تسلا و(17.261 - 29.13 نانومتر لمستخلصات المزارع المعلقة.

فضلاً عن ذلك استخدم التحليل الطيفي المشتت للطاقة Energy Dispersive X-ray (EDX) لمعرفة نسبة دقائق الفضة النانوية المصنعة من المزارع المختلفة، وإثبتت النتائج نجاح إنتاج الفضة النانوية وبنسب مختلفة باختلاف نوع المزارع النسيجية المستخدمة واختلاف قيمة الدالة الحمضية pH للمستخلصات، إذ بلغت أعلى نسبة مئوية لإنتاج جسيمات الفضة النانوية 4.46% في مستخلصات المزارع المعلقة عند pH 12، يليها مستخلصات الكالس القياسي إذ بلغت نسبتها 4.12% عند pH 12 وأخيراً مستخلصات الكالس المعرض للمجال المغناطيسي لمدة 90 دقيقة بشدة 400 ملي تسلا إذ بلغت أعلى نسبة لإنتاج الفضة 3.84% عند pH 12.

وتضمن المحور الثالث من هذه الدراسة بيان تأثير جسيمات الفضة النانوية AgNPs المحضرة خضرياً (من مزارع الكالس القياسية والمعرضة للمجال المغناطيسي ومزارع المعلقة الخلوية) وبمختلف درجات الحمضية المعتمدة على النمو البكتيري لنوعين من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (*S.oreus* و *E.coli*) على التوالي، ومقارنة القدرة التثبيطية مع المستخلصات المائية وحدها والمضاد الحيوي CTX بدلالة قياس قطر التثبيط وحسب طريقة انتشار القرص.

III

وأثبتت جسيمات الفضة النانوية فعاليتها في تثبيط نمو البكتريا بنوعيتها إذ تراوح قطر التثبيط (12- 35 ملم) حسب نوع المستخلص ودرجة الحامضية المطبقة للمستخلص، وكان لجسيمات الفضة النانوية المنتجة من مستخلصات المعلقات الخلوية اعلى قدرة تثبيطية عن بقية المستخلصات وبجميع درجات الحامضية للمستخلص، وتمثل هذه الفعالية التثبيطية إحدى أهم الخصائص الطبية لجسيمات الفضة النانوية.

Abstract

The first part of the study aimed to find out the effects of the magnetic field (400 mT) for different periods of time (0 , 30 , 60 , 90 , 120 , 150) minutes in the ratio of seed germination and seedling growth of *Nigella sativa*. Also, the effects of the magnetic field on development and growth of callus and some different biochemical indicators in the callus were investigated as well as the content of important nutrients. Furthermore, the effect of the magnetic field on the rate of accumulation of the medicinal compound thymol in the tissues of callus cultures using the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) was inspected.

The current study succeeded in proving the catalytic role of the magnetic field in stimulating seed germination and seedling growth, with a germination rate reaching 96% at an exposure period of 90 minutes compared to the standard sample. The average length of stems and roots for seedlings were (9.5, 7.5 cm), respectively for the same exposure period of 90 minutes. Moreover, an increasing in the rate of callus initiation was observed where the highest rate of initiation reached 99% when exposing explants of *Nigella sativa* seedlings to the magnetic field for 30 minutes.

The results showed a remarkable success of the magnetic field in increasing the studied biochemical indicators of callus in which the callus recorded the highest growth by 99.2% and the highest fresh weight of 5.3 g when exposed to the magnetic field for 90 minutes. The results also revealed that the magnetic field has a clear role in raising the vitality of the callus and the amount of protein and dissolved sugars to reach their highest levels (95%, 25 mg/g, 122 mg/g), respectively in the callus exposed to the magnetic field for 90 minutes .

The effects of the magnetic field on the antioxidant system in the callus cultures was evident, as the reason for the high content of proline and the enzymes catalase CAT and peroxidase POD in conjunction with increasing the

B

exposure period to the magnetic field to 150 minutes to reach the highest concentration of proline (11 µg /g) and the highest enzymatic activity of catalase and peroxidase (0.749 and 0.590 units/mL), respectively after 5 days and (0.950 and 0.739 units/mL) after 25 days exposure .

The magnetic field had a variable effects on the availability of some nutrients in the callus culture i.e., the concentrations of Zn, Mg, Mn, K and Na increased with increasing exposure to the magnetic field recording the highest concentration at an exposure period of 90 minutes. However, the concentrations of Fe and Cu decreased from the standard sample when exposed to the magnetic field.

The magnetic field did not cause a significant change in the accumulation of thymol in the first-age of callus culture, as its concentration began to decrease when exposed to the magnetic field compared to standard callus culture (not exposed to the magnetic field)where the concentration of thymol reached (5.51862 mg/mL) .

The second part of the current study included an extensive work protocol which up to our search and knowledge it invistigated for the first time globally. This protocol was concerned with the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) from *Nigella sativa* (standard and magnetic field-exposed and suspended cultures) callus cultures in which the work included investigating the susceptibility of standard and magnetic field-exposed cultures of callus and cellular suspension cultures on the synthesis of silver nanoparticles.

The results confirmed the success of the process of green manufacturing AgNPs from *Nigella sativa* callus by several tests; including the color change in the reaction solution from colorless to brown and reddish-brown as a result of the reduction of Ag ions in the extract after addition of AgNO₃ solution in a volumetric ratio (1:1 v/v).

UV-Vis spectroscopy was used to initially prove the existence of AgNPs , which showed an absorption peak ranging between (400-440 Nm) caused by the phenomenon of Surface Plasmon Resonance (SPR) of AgNPs.

In order to characterize AgNPs synthesised in different cultures, Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to determine the shape and size of AgNPs, as this technique showed nanoparticle objects ranging from (18.341 - 40.932) nm for standard extracts and (22.585-42.2) nm for callus extracts exposed to the magnetic field and (17.261 - 29.13) nm for suspended cultures extracts .

In addition, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) was used to find out the % of AgNPs synthesised from different cultures where the results proved the success of producing AgNPs in different proportions depending on the type of tissue cultures used and the difference in the pH value of the extracts, as the highest % of AgNPs production reached 4.46% in suspended cultures extracts from pH 12, followed by standard callus extracts, which reached 4.12% at pH 12 and finally the extracts of callus exposed to the magnetic field, where the highest % of Ag production reached 3.84% at pH 12 .

The third part of this study included the demonstration of the effects of AgNPs prepared biologically (from standard callus cultures, cultures exposed to the magnetic field and cell suspension cultures) and with different degrees of acidity depending on bacterial growth of 2 types of negative and positive bacteria for Gram dye (*E. coli* and *Staph. aureus*), respectively, and comparing the inhibitory ability with aqueous extracts alone, and antibiotic CTX in terms of measuring the diameter of inhibition and by the method of disc diffusion.

AgNPs proved their effectiveness in inhibiting the growth of bacteria in both types, as the inhibition zone ranged (12– 35 mm) depending on the type of extract and the degree of acidity pH applied to the extract, and this inhibitory effectiveness represents one of the most important medicinal properties of AgNPs

University of Mosul
College of Sciences



**Bioproduction of nanosilver particles in the callus
and suspended cells of *Nigella sativa* L. exposed to
the magnetic field**

Sawsan Jamal Anwar Sulaiman Al-Allaf

M.Sc. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Rehab Abdel-Jabbar Hamed Al-Bakr

1444 A.H.

2022 A.D.